

# **INAUGURAL - DISSERTATION**

zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht- Karls- Universität  
Heidelberg

vorgelegt von  
Diplom-Biologe Kai Schöning  
aus Römerberg  
2003

Tag der mündlichen Prüfung:

**Der LC-1-Locus im Mausgenom: ein geeigneter Ort für die stringente  
Regulation von „Transgenen“ via Tetrazyklin ?**

Gutachter:

Prof. Dr. Hermann Bujard

Prof. Dr. Renato Paro

Diese Arbeit wurde am Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg (ZMBH) in der Zeit vom Februar 1999 bis zum Februar 2003 unter der wissenschaftlichen Anleitung von Prof. Dr. H. Bujard durchgeführt.

Ich möchte ihm an dieser Stelle ganz herzlich für seine Betreuung danken. Mein Dank gilt auch meinen derzeitigen und früheren Arbeitskollegen, insbesondere Jun Miao, David Kemtner und Christiane Schirra-Müller, die das Gelingen dieser Arbeit unterstützt haben.

Ein besonderer Dank geht an alle Mitarbeiter der Versuchstierhaltung des ZMBHs, Frank Zimmermann und Sascha Dlugosz für die DNA-Mikroinjektionen, Sandra Fiala, Yvonne Michelberger und Ulrike Gärtner für die Betreuung der Mäuse und Unterstützung bei den Mausexperimenten.

Schließlich möchte ich mich auch bei meinen Eltern und meinen Freunden bedanken, die mir das Studium ermöglicht und die Zeit in Heidelberg unvergeßlich gemacht haben.

Meinen Eltern und Rike



<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Geninaktivierung in Mäusen durch ES-Zell-Technologie</b>	<b>2</b>
1.1.1	Homologe Rekombination	2
1.1.2	Konditionale Genveränderung durch sequenzspezifische Rekombinasen	3
1.1.3	Induzierbare Rekombinasen	4
<b>1.2</b>	<b>Induzierbare Genregulationssysteme in höheren Zellen und transgenen Mäusen</b>	<b>6</b>
1.2.1	Homologe Expressionssysteme	7
1.2.2	Heterologe Expressionssysteme	8
1.2.3	Die Tetrazyklin-regulierbare Aktivierung der Genexpression	11
1.2.3.1	Das tTA-System	11
1.2.3.2	Das (reverse) rtTA-System	12
1.2.3.3	Weiterentwicklungen des Tet-Regulationssystems	14
1.2.3.4	Etablierung des Tet-Systems in transgenen Mäusen: grundsätzliche Überlegungen und Limitierungen	15
1.2.3.4.1	Herstellung von tTA/rtTA-Mauslinien	16
1.2.3.4.2	Herstellung von transgenen Mäusen mit Tet-regulierten Expressionseinheiten	17
<b>1.3</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>19</b>
1.3.1	Herstellung einer leberspezifischen rtTA-Linie und Analyse der Tet-regulierten Genexpression in der LC-1-Linie	19
1.3.2	Klonierung und Analyse eines S/A-Locus	21
<b>2.</b>	<b>MATERIALIEN</b>	<b>23</b>
<b>2.1</b>	<b>Laborausstattung</b>	<b>23</b>
<b>2.2</b>	<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>24</b>
<b>2.3</b>	<b>Chemikalien</b>	<b>25</b>
<b>2.4</b>	<b>Radioisotope</b>	<b>26</b>
<b>2.5</b>	<b>Enzyme</b>	<b>26</b>
<b>2.6</b>	<b>Antikörper</b>	<b>26</b>
<b>2.7</b>	<b>Nukleinsäuren</b>	<b>26</b>
2.7.1	Oligonukleotide und Sequenzierprimer	26
2.7.2	Plasmide	28
2.7.3	DNA-Marker	28
<b>2.8</b>	<b><i>E. coli</i> Stämme</b>	<b>28</b>
<b>2.9</b>	<b>Zelllinien</b>	<b>28</b>

<b>2.10</b>	<b>Mauslinien</b>	<b>28</b>
<b>2.11</b>	<b>Puffer, Lösungen, Medien</b>	<b>29</b>
<b>3.</b>	<b>METHODEN</b>	<b>33</b>
<b>3.1</b>	<b>DNA-Transfer in <i>E. coli</i>-Zellen</b>	<b>33</b>
3.1.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen für die CaCl <sub>2</sub> -Methode	33
3.1.2	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen für die Elektroporation	33
3.1.3	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen nach der CaCl <sub>2</sub> -Methode	33
3.1.4	Schnellmethode zur Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	34
3.1.5	Elektrotransformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	34
<b>3.2</b>	<b>Isolierung und Aufreinigung von DNA</b>	<b>34</b>
3.2.1	Schnellmethode zur Aufreinigung superhelikaler Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> -Zellen (Plasmid-Minipräparation)	34
3.2.2	Aufreinigung superhelikaler Plasmid-DNA über Anionenaustauscher-Chromatographie	35
3.2.3	Aufreinigung chromosomaler DNA aus Schwanzgewebe der Maus	35
3.2.4	Aufreinigung chromosomaler DNA aus Leberzellen	36
3.2.5	Extraktion von Proteinen aus Nukleinsäurelösungen (Phenolextraktion)	37
3.2.6	Photometrische Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäurelösungen	37
<b>3.3</b>	<b>Analyse von DNA</b>	<b>37</b>
3.3.1	Fragmentierung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	37
3.3.1.1	Fragmentierung von genomischer DNA in Agarose-Blöckchen	38
3.3.1.2	Partieller Verdau von genomischer DNA in Agarose-Blöckchen durch Methylase Kompetition	38
3.3.2	Gelelektrophoretische Analyse von Nukleinsäuren	39
3.3.2.1	Auftrennung von dsDNA in nativen Polyacrylamid-Gelen	39
3.3.2.2	Auftrennung hochmolekularer DNA und topologischer Isomere im Agarosegel	39
3.3.2.3	Auftrennung hochmolekularer DNA durch PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis)	40
3.3.3	Anfärben von Nukleinsäuren in Gelen mit Ethidium-Bromid	40
3.3.4	Identifizierung spezifischer DNA-Fragmente in chromosomalen DNA-Präparationen durch „Southern-Blot“-Analyse	41
<b>3.4</b>	<b>In vitro-Modifikation und Rekombination von DNA</b>	<b>41</b>
3.4.1	Isolierung von DNA-Fragmenten aus PAA-oder Agarose-Gelen	41
3.4.1.1	Elektroelution mit Hilfe der Salzfalle	41
3.4.1.2	Elektroelution in Dialyseschläuche	42
3.4.1.3	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	42

3.4.1.4	Präparative Aufreinigung von BAC-Fragmenten	42
3.4.2	Auffüllen von 5'-überhängenden, bzw. Entfernen von 3'-überhängenden, einzelsträngigen DNA-Enden durch T4 DNA-Polymerase	43
3.4.3	Dephosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Fragmenten durch alkalische Phosphatase	44
3.4.4	Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten	44
3.4.5	Kovalentes Verknüpfen von DNA-Fragmenten durch T4 DNA-Ligase	44
3.4.6	Amplifizierung von DNA-Fragmenten in der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	44
<b>3.5</b>	<b>Kultivierung von Säugerzellen</b>	<b>45</b>
3.5.1	Wachstum von Zellkulturen	45
3.5.1.1	Hela Zellen	45
3.5.1.2	Gewinnung und Kultur primärer Mausohr-Fibroblasten (MOF-Zellen)	45
3.5.2	Passagieren der Zellen	46
3.5.3	Einfrieren und Auftauen der Zellen	46
<b>3.6</b>	<b>DNA-Transfer in Säugerzellen</b>	<b>47</b>
3.6.1	Transiente Kalzium-Phosphat-Transfektion von Plasmid-DNA in Säuger-Zellen	47
3.6.2	Transiente „Lipofektion“ von Plasmid- und BAC-DNA in Säuger-Zellen	47
3.6.3	Quantifizierung von Transfektionsexperimenten	47
3.6.3.1	Herstellung von Zell-Lysaten	47
3.6.3.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen nach Bradford	48
3.6.3.3	Das Luziferase-Reportersystem	48
3.6.3.4	$\beta$ -Galaktosidase als Reporter in der Zellkultur	48
<b>3.7</b>	<b>Etablierung stabil transfizierter Zelllinien</b>	<b>49</b>
<b>3.8</b>	<b>Biolumineszenz-Analyse zur Identifikation Luziferase-synthetisierender Zellen in vivo</b>	<b>50</b>
<b>3.9</b>	<b>Haltung und Herstellung von transgenen Mäusen</b>	<b>50</b>
3.9.1	Haltung von Mäusen als Versuchstiere	50
3.9.2	Applikation von Tetrazyklinen	51
3.9.2.1	Doxyzyklin-Konzentrationen im tTA-System	51
3.9.2.2	Doxyzyklin-Konzentrationen im rtTA –System	52
3.9.3	DNA-Transfer in die Keimbahn von Mäusen	52
3.9.4	Betäubung von Mäusen mit Avertin	52
3.9.5	Aufreinigung und Analyse von mRNA aus Lebergewebe der Maus	52
3.9.6	Extraktion von Mausorganen für den Luziferasetest	53
3.9.7	In situ- $\beta$ -Galaktosidase-Nachweis in Mäusegeweben	53
3.9.8	Immunperoxidase-Färbung von Gewebeschnitten	54
<b>4.</b>	<b>ABKÜRZUNGEN UND DEFINITIONEN</b>	<b>55</b>

<b>4.1</b>	<b>Abkürzungen</b>	<b>55</b>
<b>4.2</b>	<b>Einheiten</b>	<b>57</b>
<b>4.3</b>	<b>Vorsätze</b>	<b>57</b>
<b>4.4</b>	<b>Nukleotide</b>	<b>57</b>
<b>4.5</b>	<b>Definitionen</b>	<b>58</b>
<b>5.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>59</b>
<b>5.1</b>	<b>Charakterisierung der LC-1 Linie</b>	<b>59</b>
5.1.1	Bestimmung der basalen Luziferase Aktivität in der LC-1-Linie	59
5.1.2	Untersuchung der basalen Aktivität der Cre Rekombinase in der LC-1-Linie	60
5.1.3	Bestimmung der Luziferase-Aktivität in TA <sup>LAP</sup> -2/LC-1 Tieren in Abhängigkeit von Doxyzyklin	61
<b>5.2</b>	<b>Mauslinien zur leberspezifischen Expression des <i>rtTA2<sup>S</sup>S2</i>-Gens</b>	<b>62</b>
5.2.1	Herstellung der rTA <sup>LAP</sup> -1 Linie	62
5.2.2	Quantifizierung der Luziferaseexpression in adulten rTA <sup>LAP</sup> -1/LC-1 Tieren	63
5.2.2.1	Analyse der Koexpression von Luziferase und Cre auf mRNA-Ebene	64
5.2.3	Induktion des <i>luc</i> -Gens in rTA <sup>LAP</sup> -1/LC-1-Tieren während der Entwicklung	65
5.2.3.1	In situ-Analyse der rTA-vermittelten lacZ-Expression in rTA <sup>LAP</sup> -1/nZL-2-Tieren	67
5.2.4	Lokalisation der Expression des <i>cre</i> -Gens in der Leber von rTA <sup>LAP</sup> -1/LC-1-Mäusen	68
5.2.5	Messung der Luziferase-Reporterfunktion <i>in vivo</i>	69
5.2.5.1	Kinetik der Tetrazyklin-kontrollierten Genexpression <i>in vivo</i>	70
5.2.6	Tetrazyklin-induzierbare Rekombination in triple transgenen rTA <sup>LAP</sup> -1/LC-1/R26R-Mäusen	73
5.2.6.1	In situ-Analyse der Rekombination in Gewebeschnitten	73
5.2.6.2	PCR-Analyse der Cre-vermittelten Rekombination	75
<b>5.3</b>	<b>Klonierung und Charakterisierung des LC-1-Locus</b>	<b>77</b>
5.3.1	Klonierung des Integrationslocus der LC-1 Linie	77
5.3.1.1	Herstellung des BAC-Vektors pBeloBAC-HD	77
5.3.1.2	Herstellung der LC-1 BAC-Bank	79
5.3.1.3	Bestimmung der durchschnittlichen Größe der DNA-Fragmente in der BAC-Bank	80
5.3.1.4	Identifikation positiver Klone	81
5.3.1.5	Aufbau und genomische Lokalisierung der BACs	83
5.3.2	Funktionale Charakterisierung der BACs	85
5.3.2.1	Zellkultorexperimente	85
5.3.2.2	Herstellung transgener Mäuse mit dem E11 BAC	86
5.3.2.3	Analyse von primären Mausohr-Fibroblasten-Kulturen der E11-Stammtiere	87

5.3.2.4	Analyse der E11-Stammtiere durch Verpaarung mit Transaktivator-Mäusen	88
5.3.2.5	Rekombinations-Induktion in der Leber und Niere von E11-1/rTA <sup>LAP</sup> -1/R26R Mäusen	92
<b>5.4</b>	<b>Sequenzanalyse des klonierten genomischen E11-Fragments</b>	<b>93</b>
5.4.1.1	Suche nach Promotoren und codierenden Sequenzen	93
5.4.1.2	Identifikation von „Matrix Attachment Regions“	94
<b>6.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>97</b>
<b>6.1</b>	<b>Charakterisierung der Linie rTA<sup>LAP</sup>-1</b>	<b>97</b>
<b>6.2</b>	<b>Charakterisierung der LC-1 Linie</b>	<b>100</b>
6.2.1	Untersuchung der Basalaktivität und des Regulationspotentials der LC-1-Linie	100
6.2.2	Nachweis der Koexpression von <i>luc</i> und <i>cre</i>	101
6.2.3	Untersuchungen zu PEV und der funktionalen Ausprägung der Cre-Rekombinase in der LC-1-Linie	102
6.2.4	Etablierung einer Methode zur <i>in vivo</i> -Darstellung von Reportergenaktivitäten	103
6.2.5	Kinetik der tTA- und rtTA-vermittelten Induktion in LC-1-Tieren	104
6.2.6	Eignung der LC-1-Linie für die kontrollierte Cre-vermittelte Rekombination <i>in vivo</i>	105
<b>6.3</b>	<b>Der genomische Integrationsort der LC-1-Linie - ein S/A-Locus?</b>	<b>106</b>
<b>6.4</b>	<b>Isolierung des LC-1 Locus als BAC</b>	<b>106</b>
6.4.1	Analyse des BAC E11-Fragments im genomischen Kontext	107
6.4.1.1	Herstellung von stabilen Hela-Zellklonen	107
6.4.1.2	Herstellung von transgenen Mäusen mit dem E11-BAC	108
6.4.2	Der E11-Locus	110
<b>6.5</b>	<b>Ausblick</b>	<b>112</b>
<b>7.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>116</b>
<b>8.</b>	<b>VERÖFFENTLICHUNGEN</b>	<b>117</b>
<b>9.</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>118</b>
<b>10.</b>	<b>ANHANG</b>	<b>131</b>
10.1	Grafische Darstellung des Plasmids pUHRt61-30	131
10.2	Grafische Darstellung des BAC-Vektors pBeloBAC-HD	131
10.3	Ergebnisse der Sequenzanalyse des in BAC E11 klonierten genomischen DNA-Fragments	131

## 1. Einleitung

Bis vor wenigen Jahren war es kaum vorstellbar, wie sich unsere Kenntnisse von Sequenzen kompletter Genome unterschiedlichster Organismen bis heute erweitern würde. Für die wichtigsten Modellorganismen der biologischen Forschung - *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Arabidopsis thaliana*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* und *Mus musculus*- liegen inzwischen vollständige oder nahezu vollständige Sequenzinformationen vor. Das humane Genom-Projekt führte zu einer sehr detaillierten auf DNA-Sequenzen beruhenden Genkarte des Menschen, deren „weiße Stellen“ in rascher Folge eliminiert werden. Darüber hinaus nimmt die Zahl der sequenzierten Genome von Krankheitserregern - einschließlich so komplexer Organismen wie des Malariaerregers *Plasmodium falciparum* und seines Vektors, der Mücke *Anopheles gambiae* - rapide zu. Nicht nur für die biologische Grundlagenforschung, sondern auch für biomedizinische und weitere Fragestellungen der angewandten Forschung sind diese Erkenntnisse von unschätzbarem Wert.

Die Zugänglichkeit zu diesen genomischen Sequenz-Daten führt zusammen mit den Fortschritten in der Bio-Informatik zu einer Flut von Informationen über potentielle Genfunktionen sowie über neue Gene und ihre Produkte. Durch die Erstellung von Gen-Expressions-Profilen mit Hilfe von „high-throughput“-Techniken werden zusätzlich große Datenmengen erhalten, die uns Informationen über die zeitliche und räumliche Verwirklichung der Genexpression vermitteln. Für den Biochemiker nicht überraschend, führt die Sequenz-Analyse, z.B. von humanen Genen, was die entsprechenden Funktionen betrifft, oft zu keinem Ergebnis. So konnten bisher erst weniger als 5000 der ca. 30.000 humanen Gene Funktionen zugeordnet werden (Nadeau *et al.*, 2001).

Offensichtlich benötigen wir zunehmend Methoden, welche es ermöglichen, die Funktion von Genen *in vivo*, d.h. in einem Modellorganismus, zu analysieren. Aufgrund ihrer evolutionären Nähe zum Mensch und ihrer genetischen Zugänglichkeit ist die Maus zum bedeutendsten Modellorganismus für das Studium von Genfunktionen und Krankheiten in Säugetieren einschließlich des Menschen geworden.

Eine Methode, Informationen über die Funktion eines Gens in der Maus zu erlangen, ist dessen gezielte Inaktivierung („Knock-out“). Dabei wird ein Gen ganz oder teilweise eliminiert oder in seiner Expression gehindert. Die hierbei angewandte Technik der homologen Rekombination setzt embryonale Stamm (ES)- Zellen als experimentelles System voraus. Bei der zweiten bewährten erfolgreichen Methode, bringt man gezielt veränderte

Gene als sog. Transgen in die Maus ein und beobachtet den entstehenden Phänotyp. Der Erfolg dieser Strategien hat die klassische Mausgenetik revolutioniert.

## **1.1 Geninaktivierung in Mäusen durch ES-Zell-Technologie**

### **1.1.1 Homologe Rekombination**

ES-Zellen sind pluripotente Zellen, die aus dem Gewebe von sehr jungen Maus-Embryonen (Tag 3,5) gewonnen werden. Da man sie quasi unbegrenzt in Kultur halten kann, ist es möglich stabile Transfektionsexperimente durchzuführen. Auf diese Weise kann man leicht genomische DNA-Fragmente einbringen, die im Vergleich zu dem endogenen Sequenzabschnitt verändert sind. Geeignete Verfahren erlauben anschließend die Selektion auf seltene Rekombinationsereignisse, die sich zwischen der eingebrachten DNA und der endogenen Sequenz der embryonalen Stammzelle ereignen (Thomas & Capecchi, 1987). Wird durch diese Technik die Wildtyp (wt) -Sequenz eines Gens mit der einer Mutante ersetzt, so spricht man von einem „Knock-in“- Experiment, im Falle einer völligen Inaktivierung eines Gens von einem „Knock-out“- Experiment.

Die embryonalen Stammzellen können sich nach der Manipulation weiterhin in sämtliche Gewebe differenzieren. Dies ist durch Mikroinjektion der ES-Zellen in den Hohlraum einer Blastozyste möglich. In diesem Umfeld nehmen die mutierten Stammzellen am normalen Entwicklungsprozess des Maus-Embryos teil. Mäuse, die durch diese Technik erzeugt werden, nennt man Chimäre, da sie sich zum Teil aus eigenen, aber auch aus den manipulierten Stammzellen entwickeln. Mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit bilden die injizierten Stammzellen in den chimären Mäusen auch die Zellen der Keimbahn, sodass die Anlagen der veränderten embryonalen Stammzellen an die folgende Generation (zunächst heterozygot) weitergegeben werden. Durch die Analyse des Phänotyps der so gewonnenen Mäuse im Vergleich zu wt-Mäusen kann man Rückschlüsse auf die Funktion des veränderten Gens schließen.

Der große Nachteil dieser Methodik besteht darin, dass die eingeführte Mutation nicht nur in jeder Körperzelle, sondern auch in jedem Stadium der gesamten Ontogenese des sich entwickelnden Mausembryos wirken kann. Aus diesem Grund kommt es in mehr als 30% der Fälle zu Fehlentwicklungen, bzw. zu embryonaler Letalität (Kühn & Schwenk, 2002). Eine Aussage über die Funktion des Zielgens ist dann häufig nicht schlüssig, da z.B. der auftretende Phänotyp nicht die Funktion des zu untersuchenden Gens in einem bestimmten Gewebe, sondern vielmehr die Summe von Defekten in verschiedenen Zellen und zu verschiedenen Zeitpunkten während der Entwicklung reflektiert. Zusätzlich können

kompensatorische Mechanismen die Funktion des fehlenden oder veränderten Genprodukts übernehmen und so die Analyse erschweren bzw. unmöglich machen.

### 1.1.2 Konditionale Genveränderung durch sequenzspezifische Rekombinasen

Die Probleme der Genveränderung durch homologe Rekombination in ES-Zellen können z.T. durch die Verwendung von sequenzspezifischen Rekombinasen umgangen werden (Metzger & Feil, 1999). Mit diesen Enzymen ist es möglich, ein Gen spezifisch in bestimmten Geweben bzw. Zelltypen zu inaktivieren oder zu verändern, während es in allen anderen Körperzellen intakt bleibt.

Zwei Rekombinasen mit homologer Funktion wurden in transgenen Mäusen in den letzten Jahren eingesetzt: die Cre-Rekombinase aus dem Bakteriophagen P1 und die FLP-Rekombinase aus *Saccharomyces cerevisiae*. Beide Rekombinasen gehören aufgrund ihres Reaktionsmechanismus zu der Familie der Lambda-Integrasen. Sie katalysieren ein Rekombinationsereignis zwischen zwei ihrer Erkennungsstellen (*loxP* für Cre und *FRT* für FLP). Dies führt je nach Anordnung der *loxP* bzw. *FRT*-Sequenzen zum Ausschneiden, zur Integration oder zur Inversion eines DNA-Stückes. Die Erkennungsstelle ist eine 34 Bp lange Konsensussequenz mit einer zentralen 8 Bp langen Kern-Region und zwei flankierenden 13 Bp langen palindromischen Wiederholungen (Sternberg *et al.* 1986, siehe Abb. 1). Der molekulare Mechanismus der sequenzspezifischen Rekombination ist z.B. in Voziyanov *et al.* (1999) beschrieben. Zusammenfassend sei erwähnt, dass die Rekombinationsreaktion die Bindung eines Dimers der Rekombinase an die palindromische Sequenz voraussetzt. Durch Tetramer-Bildung werden dann die beiden Stränge zusammengebracht und innerhalb der Kern-Region geschnitten. Anschließend kommt es zu einem Strang-Austausch und zur erneuten Verknüpfung der DNA Stränge innerhalb der Kern-Sequenz.



**Abb.1: *loxP*-DNA-Erkennungssequenz der Cre-Rekombinase**

Die Asymmetrie der zentralen Sequenz verleiht der *loxP*-Erkennungssequenz eine Orientierung. Je nachdem wie die beiden Erkennungsstellen zueinander orientiert sind, kommt es zu einer Strang-Inversion oder Exzision.

Wichtig für den Einsatz in der Maus ist, dass die hier beschriebenen sequenzspezifischen Rekombinasen keine zusätzlichen Faktoren für die Reaktion erfordern, und dass die Erkennungssequenzen im Mausgenom nicht vorhanden sind.



In transgenen Mäusen wird bislang vor allem die Cre-Rekombinase zur konditionalen Genveränderung verwendet. Die eigentliche Funktion der 38kD-Rekombinase im *E.coli*. P1 Phagen ist das Auflösen von Plasmid-Multimeren in Monomere (Austin *et al.*, 1981). Das Genom des Phagen besitzt eine einzige *loxP*-Erkennungssequenz. Entstehen durch die Replikation Multimere, können diese durch das Rekombinationsereignis an den in gleicher Orientierung vorliegenden *loxP*-Stellen aufgelöst werden. Als Folge wird die Anzahl der segregierenden genomischen Plasmid-Moleküle erhöht.

Um die Methodik der Cre vermittelten Rekombination in der Maus anwenden zu können, sind zwei Mauslinien notwendig, die miteinander gekreuzt werden müssen. Zunächst wird eine Mauslinie hergestellt, die gewebespezifisch die Cre-Rekombinase produziert, z.B. im Gehirn der Maus (Casanova *et al.*, 2001). In der zweiten Mauslinie wird das Zielgen mit Hilfe von homologer Rekombination in ES-Zellen gegen ein intaktes Allel mit flankierenden *loxP*-Erkennungsstellen ausgetauscht (normalerweise stören die recht kurzen Erkennungssequenzen der Rekombinase die endogene Expression des Gens nicht). Nach Verpaarung der beiden Mauslinien wird in den doppelt transgenen Nachkommen das veränderte („*loxP*-flankierte“) Allel nur in den Zellen deletiert werden, in denen ausreichend Cre-Aktivität vorhanden ist. Mit dieser Methodik konnte erstmals von Gu *et al.* (1994) gezeigt werden, dass durch die Beschränkung der eingeführten Mutation auf bestimmte Zelltypen eine Beeinträchtigung der Embryonalentwicklung verhindert wird. Erst so wurde es z.B. auch möglich, die Funktionen des Insulin-Rezeptors (Brüning *et al.*, 1998; Kulkarni *et al.*, 1999; Michael *et al.* 2000), des NMDA-Rezeptors (Tsien *et al.*, 1996) oder des TrkB-Rezeptors (Minichiello *et al.*, 1999) zu analysieren.

### 1.1.3 Induzierbare Rekombinasen

Die Aktivität der sequenzspezifischen Rekombinase ist normalerweise direkt vom zeitlichen und räumlichen Expressionsmuster des Promotors zur Ausprägung des Rekombinase-Gens abhängig. Über die Embryonalentwicklung besitzen diese allerdings oft nicht die gewünschte Spezifität. Eine dauerhafte Expression der Cre-Rekombinase kann auch zu pleiotropen Effekten führen, da kryptische „Pseudo-*loxP*“-Erkennungsstellen im Säuger-genom vorkommen (Thyagarajan *et al.* 2000; Schmidt *et al.*, 2000; Silver *et al.*, 2001). Eine wichtige methodische Weiterentwicklung der konditionalen Genveränderung sind deshalb induzierbare Rekombinasen (Sauer, 1998). Diese eröffnen zusätzlich die Möglichkeit der zeitlichen Kontrolle des Rekombinationsereignisses.

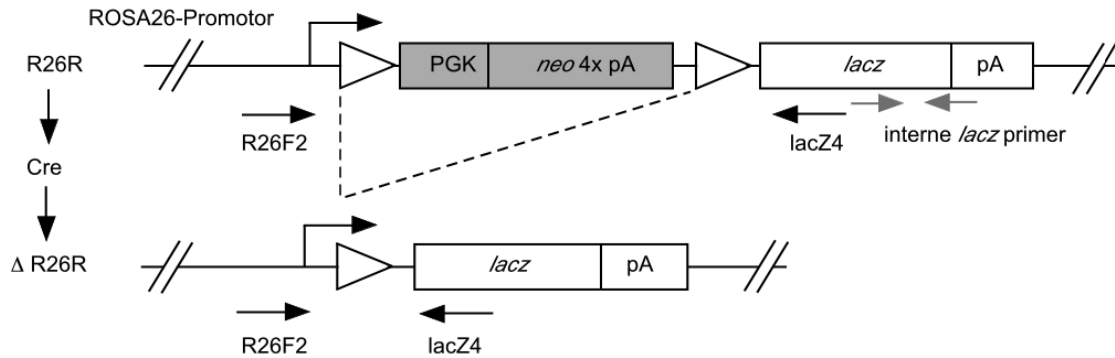
Die Voraussetzung für die konditionale Expression einer Rekombinase ist vor allem eine dichte Regulation. Schon eine niedrige Basalexpression kann über längere Zeit zu einem

Rekombinationsereignis führen. Trotzdem muss nach der Induktion eine relativ hohe Expression gewährleistet sein, denn das Rekombinationsereignis soll möglichst schnell in allen Zellen des Zielorgans erreicht werden. Manche Zielsequenzen sind für Enzyme wie die Cre-Rekombinase schwer zugänglich (Vooijs *et al.*, 2001), weshalb ebenfalls eine starke Expression des *cre*-Gens notwendig ist.

Die Kontrolle der Rekombinaseaktivität kann durch transkriptionelle oder posttranslationale Regulationsmechanismen geschehen. Letzteres kann z.B. durch die Fusion der Cre-Rekombinase mit der Ligandenbindungsdomäne (LBD) eines Steroidhormon-Rezeptors erreicht werden. Die Fusionsproteine liegen hier in Abwesenheit spezifischer Liganden in Form von inaktiven Proteinkomplexen vor, an denen Hitzeschockproteine beteiligt sind. Erst nach Zugabe der Liganden dissoziiert der Komplex und die Cre-Rekombinase wird aktiviert (Gorman & Bullock, 2000).

Der erste Versuch zur transkriptionellen Regulation wurde von Ralf Kühn aus der Arbeitsgruppe von Klaus Rajewsky unternommen. Er verwendete zur Expression des Cre-Gens einen Promotor, der durch Typ I Interferon (IFN- $\alpha/\beta$ ) aktivierbar ist (Mx-1-Promotor). Durch die Gabe von IFN- $\alpha/\beta$  konnte anschließend in der Leber eine Rekombination effektiv induziert werden (Kühn *et al.*, 1995). Nachteile dieses Systems sind jedoch die Nebeneffekte, die durch das induzierende Hormon erzeugt werden. Eine Alternative dazu ist die Kontrolle der Expression des *cre*-Gens mit Hilfe der Tetrazyklin-kontrollierten Transkription. Dieser Weg wurde in unserem Labor in einer Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Klaus Rajewsky besprochen, ich werde später näher darauf eingehen.

Zur Untersuchung von Mauslinien, die gewebespezifisch das *cre*-Gen ausdrücken, können Reporter-Linien verwendet werden. Eine solche Linie (*R26R*) wurde z.B. von P. Soriano (1999) hergestellt. Diese Linie trägt ein Rekombinationssubstrat der Cre-Rekombinase, nach dessen erfolgreicher Rekombination ein *lacZ*-Gen aktiviert wird. Die Rekombinations-Reaktion kann auf DNA-Ebene oder in Gewebeschnitten durch eine Farbreaktion der  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal) nachgewiesen werden. Das Cre-Reporterkonstrukt der *R26R*-Mäuse ist in Abb. 2 dargestellt.



**Abb. 2 Der genomische Locus der R26R-Linie zum Nachweis von Cre-Aktivität**

In R26R-Mäusen ist eine *lacZ*-Expressionseinheit in einen Locus integriert, der transkriptionell ubiquitär aktiv ist (ROSA26-Lokus). Durch das Einfügen eines *loxP*-flankierten Neomycin-Resistenzgens in das offene *lacZ*-Leseraster wird dessen Expression verhindert. Die Cre-vermittelte Rekombination bringt das *lacZ*-Gen unter die Kontrolle des ROSA26-Promotors, sodass das Gen ausgeprägt wird. Das Expressionsmuster der Cre-Rekombinase kann so auf Einzelzelebene verfolgt werden. *LoxP*-Erkennungsstellen sind als Dreiecke dargestellt, pA: Poladenylierungssignale.

Ein grundsätzlicher Nachteil der Methodik der Rekombinase-vermittelten Genveränderung ist, dass sie nach dem Prinzip „alles oder nichts“ funktioniert. Die einmal induzierte Genveränderung ist nicht reversibel, d.h. ein Gen kann entweder einmal aktiviert oder ausgeschaltet werden. Eine partielle Induktion oder die gewebespezifische Überexpression eines Transgens ist mit dem Cre/*loxP*-System sehr schwierig oder gar nicht möglich.

## 1.2 Induzierbare Genregulationssysteme in höheren Zellen und transgenen Mäusen

Die einfachste Möglichkeit, eine ektopische Überexpression eines Transgens in der Maus zu erreichen, ist die Methode der DNA-Mikroinjektion in befruchtete Eizellen (Palmiter & Brinster, 1986; Hogan *et al.*, 1994). Initial wurden dazu Expressionskonstrukte mit konstitutiv aktiven - z.T. gewebespezifischen - Promotoren verwendet, die nach der Mikroinjektion zufällig in das Mausgenom eingebaut werden. Ist der verwendete Promotor aber z.B. auch während der Embryonalentwicklung aktiv, kann es hier ebenfalls zu Fehlentwicklungen oder zu embryonaler Letalität kommen. Aus diesem Grund wurden Genregulationssysteme entwickelt, mit denen eine räumliche und zeitliche Kontrolle der Ausprägung des Transgens erreicht werden kann. Diese Strategie sollte es ermöglichen, die Expression des Gens erst im adulten Tier zu induzieren und - wenn sinnvoll - mehrfach an- und wieder auszuschalten.

Die Verwirklichung der genetischen Information wird auf mehreren Ebenen kontrolliert. Die Kontrolle der Transkription ist dabei eine erste wichtige Ebene, sowohl in Bakterien als auch in höheren Zellen. Die meisten Regulationssysteme zielen daher auf die Kontrolle der

Transkription ab, wobei man zwischen homologen und heterologen Systemen unterscheidet (siehe auch Saez *et al.*, 1997 oder Lewandoski *et al.*, 2001).

### 1.2.1 Homologe Expressionssysteme

Homologe Expressionssysteme in Säugerzellen basieren auf endogenen, d.h. zelleigenen Komponenten der Genregulation. In diesen Regelkreisen wird durch einen äußeren Stimulus, wie z.B. Schwermetalle, Steroidhormone oder die Veränderung der Temperatur, die Wechselwirkung zwischen Transkriptionsfaktoren und ihren spezifischen DNA-Bindungsstellen in den jeweiligen Promotoren positiv oder negativ beeinflusst. Dadurch wird die Aktivität der Promotoren reguliert (Yarranton, 1992).

Kombiniert man eukaryotische Minimalpromotoren, die im Idealfall selbst inaktiv sind, mit den DNA-Bindungsstellen von spezifischen durch einen Induktor aktivierbare Transkriptionsfaktoren, wird die Expression eines Zielgens durch den Induktor regulierbar. Solche synthetische Promotoren wurden z.B. mit „metal responsive elements“ (MRE, Thiele *et al.*, 1992) und Elementen des hsp70 Gens aus *Drosophila* oder der Maus konstruiert (Bevilacqua *et al.*, 1995). Mit diesen Konstrukten lässt sich dann die Aktivität des Zielgens durch die Gabe von Zink oder Cadmium bzw. durch die Erhöhung der Temperatur regulieren (Searle *et al.*, 1985; Nover *et al.*, 1991). Diese homologen Expressionssysteme haben jedoch einige gravierende Nachteile: Ihr Regulationspotential ist relativ gering und sie besitzen häufig eine hohe Basalaktivität. Schließlich mangelt es ihnen an Spezifität, da Schwermetalle bzw. die Erhöhung der Temperatur pleiotrope Effekte verursachen. Die Interpretation der mit diesen Systemen erhaltenen Daten ist daher erschwert.

Erfolgreicher war der Einsatz von Promotoren, die „hormone responsive elements“ (HRE) enthalten und so durch Steroidhormon-Rezeptoren aktiviert werden können. Die DNA-Bindung an die HRE wird erst durch die Gabe von Steroidhormonen induziert (Evans *et al.*, 1988). Steroidhormon-Rezeptoren sind Transkriptionsfaktoren, die als Mitglieder der nukleären Rezeptor-Superfamilie eine zentrale DNA-Bindungsdomäne und eine carboxyterminale Ligandenbindungsdomäne besitzen. Nach Induktion durch Steroidhormone dissoziiert das Rezeptor-Monomer von seinem inaktivierenden Komplex, dimerisiert mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) und kann erst dann als Heterodimer die spezifische DNA-Bindungsstelle erkennen (Kliwer *et al.*, 1992). Die RNA-PolymeraseII-vermittelte Transkriptionsaktivierung wird durch eine den Rezeptoren eigene Transaktivierungsdomäne erreicht (Gronemeyer *et al.*, 1992). Es erscheint logisch, dass durch die Induktion der artifiziellen HRE-Promotoren zur kontrollierten Expression von Zielgenen pleiotrope Effekte

ausgelöst werden, denn die zur Regulation eingesetzten zelleigenen Hormone sowie ihre Rezeptoren sind nicht ohne Einfluss auf weitere endogene Funktionen.

### 1.2.2 Heterologe Expressionssysteme

Eine Möglichkeit, die den homologen Regulations-Systemen inhärenten pleiotropen Effekte zu vermeiden, ist die Verwendung heterologer Elemente, die aus evolutionär weit entfernten Spezies stammen. Diese sollten nicht mit Komponenten endogener Regelkreise wechselwirken, und so eine monospezifische Regulation des Zielgens in Kombination mit ihrem spezifischen Induktor in Säugerzellen ermöglichen. Der zur Genregulation eingesetzte Induktor selbst sollte natürlich ebenfalls keine unerwünschten Nebenwirkungen auslösen.

Diese Überlegungen führten z.T. zur Optimierung von homologen Regulations-Systemen, die auf der Induktion durch Steroidhormone basieren. Dazu wurden artifizielle Rezeptoren konstruiert, die DNA-Bindungsstellen in eukaryotischen Minimalpromotoren erkennen, welche im Säuger genom natürlicherweise nicht vorkommen (z.B. die Gal4 DNA-Bindungsdomäne aus *Saccharomyces cerevisiae*). Das Induktions-Potential der Rezeptoren wurde durch die Fusion mit viralen oder zelleigenen Aktivierungsdomänen verbessert (z.B. mit der VP16 Domäne aus Herpes Simplex oder der des p65-Proteins des menschlichen Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B). Die Liganden dieser artifiziellen Steroid-Rezeptoren sind synthetische, pharmakologisch gut charakterisierte Steroide (RU486) oder Steroidhormone von Insekten (Ecdyson), die für die Physiologie der Säugerzelle inert erscheinen.

Die RU486-induzierbare Regulation der Genexpression konnte im Zellkultur-System (Wang *et al.*, 1994 und 1997a) und auch in transgenen Mäusen etabliert werden (Delort & Capecchi, 1996; Wang *et al.*, 1997b). Über die durch Ecdyson bzw. seine synthetischen Derivate Muristeron A und Ponasteron A induzierbaren System-Varianten existieren ebenfalls Veröffentlichungen bezüglich ihrer Funktionalität in Zellen (Christopherson *et al.*, 1992; Yao *et al.*, 1992) und transgenen Tieren (No *et al.*, 1996; Pierson *et al.*, 2000). Einen Einblick in die unterschiedlichen Anwendungen der durch Steroid-Hormon-Rezeptoren induzierten Genregulation kann man in Saez *et al.* (1997) oder in Harvey & Caskey (1998) finden.

Ein grundsätzlich anderes Prinzip fand in Systemen Anwendung, in denen eine transkriptionelle Kontrolle durch die induzierte Dimerisierung von Transkriptionsfaktoren ermöglicht wird. Bei dieser Strategie wird mit Hilfe von Dimerisierungs-Agentien die DNA-Bindungsdomäne eines künstlichen Transkriptionsfaktors mit einer Transkriptions-Aktivierungs-Domäne zu einem funktionalen Komplex verknüpft. Dieser kann dann an Minimalpromotoren mit entsprechenden Erkennungssequenzen binden und dadurch die

Transkription des Zielgens stimulieren (Rivera *et al.*, 1996; Belshaw *et al.*, 1996). Eine effiziente Kontrolle der Genexpression über drei bis vier Größenordnungen wurde mit solchen Systemen in der Zellkultur und in Mäusen demonstriert (Crabtree & Schreiber, 1996; Rivera *et al.*, 1999, Pollock & Rivera, 1999). Bei einer sehr geringen Basalaktivität in Abwesenheit des Induktors ist allerdings die maximale Induktion vergleichbar niedrig (Go & Ho, 2002). Für alle diese Systeme wurde bisher allerdings wenig über die *in vivo* erreichbare Spezifität publiziert, ihre Anwendung in der Maus erscheint daher recht begrenzt.

Durch die Verwendung von heterologen Kontrollelementen aus Bakterien kann allerdings die notwendige Spezifität erreicht werden. Hier ist aufgrund der evolutionären Distanz eine Interferenz der prokaryotischen Elemente mit den endogenen Komponenten einer Säugerzelle unwahrscheinlich, zusätzlich erscheint auch die Interaktion der Induktoren mit hoher Spezifität auf heterologe Komponenten begrenzt (Gossen *et al.*, 1993).

Grundsätzlich ist hier die Etablierung von reprimierenden und aktivierenden Systemen denkbar. Reprimierende Systeme zur Expressionskontrolle in Mäusen wurden für den Lac-Repressor (Cronin *et al.*, 2001) und den Tet-Repressor (Yao *et al.*, 1998) beschrieben. Sie basieren auf dem gleichen Prinzip wie die Genregulation in Bakterien: Die Bindung des Repressors an den Operator verhindert direkt die Bildung des Transkriptions-Initiationskomplexes. Die Operatoren müssen daher so in einer Promotorsequenz eingebaut werden, dass maximale Interferenz garantiert wird, ohne die Funktion des induzierten - d.h. Repressor-freien - Promotors zu stören. Entscheidend für stringente Kontrolle der Transkription in Säugerzellen durch Repression ist die Besetzungswahrscheinlichkeit der Operatoren innerhalb des Promotors, der zur Kontrolle des Zielgens eingesetzt wird. Nur mit einer hohen intrazellulären Repressorkonzentration kann eine effektive Repression stattfinden (Gossen *et al.*, 1993). Auf den ersten Blick erscheint ein solches System natürlich sehr attraktiv, denn im Prinzip sollte es möglich sein, durch das Einbringen der Operator-Sequenzen in endogene Promotorsequenzen (z.B. durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen) jedes beliebige Gen nach Verpaarung mit entsprechenden Lac- oder Tet-Repressor-produzierenden Mäusen reversibel über die Induktor-Gabe zu regulieren. Dadurch sollte nach Induktion das Expressionsmuster der Zielgene quantitativ und qualitativ erhalten bleiben. Die Funktionalität dieses Prinzips wurde bislang allerdings erst in kultivierten Zellen gezeigt (Itzhaki *et al.*, 1997). Zur Anwendung in der Maus fehlen quantitative Daten, sodass noch viel Fragen offen bleiben. So ist z.B. unklar, welche Promotoren sich für eine solche Regulation eignen, zudem ist es in Säugerzellen schwierig eine ausreichende Repressor-Expression für eine effiziente Repression zu erreichen (Deuschle *et al.* 1989; Scrable & Stambrook 1997).

Ein alternativer Ansatz zur Regulation der Transkription in Eukaryoten folgt der natürlichen Funktionsweise eukaryotischer Promotoren. Bei den meisten bisher gut untersuchten eukaryotischen Promotoren wird die Transkription durch den kombinatorischen Effekt von verschiedenen aktivierenden Elementen kontrolliert. Aus diesem Grund wurden Genregulationssysteme entwickelt, die auf der Aktivierung von an sich inaktiven „Minimalpromotoren“ beruhen. Die Vorteile eines Aktivierungssystems im Vergleich zu einem reprimierenden System liegen auf der Hand. So ist die maximale Besetzungsdichte der Operatoren nicht unbedingt Voraussetzung für eine effiziente Stimulierung der Transkription (Gossen & Bujard, 1992). Dadurch kann auch eine niedrige zelluläre Konzentration eines Transaktivators zu einer effizienten Aktivierung führen. Zusätzlich wird durch die Multimerisierung von Operatorsequenzen stromaufwärts des Minimalpromotors ein Synergismus auf der Ebene der Transkriptions-Aktivierung erreicht (Emami *et al.*, 1992; Gossen & Bujard, 1992, Tanaka *et al.*, 1996).

In den letzten Jahren hat sich hier zur kontrollierten Genexpression in Zell-Linien und transgenen Mäusen vor allem ein System durchgesetzt, das Tet-System (Lewandowski *et al.* 2001; Ryding *et al.*, 2001; Bockamp *et al.*, 2002). Es basiert auf den Kontrollelementen des Tn10-Tetrazyklin-Resistenzoperons aus *E. coli* (Hillen & Wissmann, 1989) und wurde in unserem Labor entwickelt.

Die Verwendung der prokaryotischen Kontrollelemente der Tetrazyklin-Resistenz für die Regulation der Transkription in Eukaryoten bietet sich wegen einiger herausragender Eigenschaften besonders an. Das Tetrazyklin-Operon reagiert schon auf sehr geringe, für die Translation in *E. coli* sub-inhibitorische Tetrazyklinkonzentrationen. Das bedeutet, dass die Induktion des Tet-Operons erfolgen muss, bevor die Translation gehemmt wird. Aus dieser Notwendigkeit heraus hat sich in den Bakterien eine Assoziationskonstante des Tet-Repressor/Tc-Komplex von  $10^9 \text{ M}^{-1}$  entwickelt (Takahashi *et al.*, 1986, Hillen & Berens, 1994). Durch diese hohe Affinität von TetR zu Tc werden auch in höheren Zellen nur sehr niedrige Effektorkonzentrationen benötigt. Zudem existiert ein breites Spektrum an Tetrazyklinderivaten, die bezüglich ihrer toxikologischen und pharmako-kinetischen Eigenschaften sehr gut charakterisiert sind (Hlavka & Boothe, 1985) und z.T. noch höhere Affinitäten zu TetR als Tetrazyklin besitzen (Degenkolb *et al.*, 1991): So bindet z.B. Doxzyklin (Dox) TetR mit einer Bindungskonstante von ca.  $1,5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ . Nicht nur die Affinität des Tet-Repressor zum Antibiotikum, sondern auch zur DNA-Bindungsstelle ist außergewöhnlich hoch - hier wurde *in vitro* eine Bindungskonstante von  $4 \times 10^{11} \text{ M}$  bestimmt (Hansen & Hillen, 1987), obwohl seine Bindungskonstante für unspezifische DNA mit  $5,5 \times 10^{-3} \text{ M}$  sehr gering ist (Kleinschmidt *et al.*, 1988). Daraus ergibt sich ein hoher

Spezifitätsfaktor von  $\approx 10^8$  als Quotient der Bindungskonstante von TetR zu unspezifischer DNA und zu *tetO*. Dies ist von großem Vorteil, wenn man TetR als DNA-bindendes Protein im Kontext eines komplexen Säuger-genoms verwendet.

### 1.2.3 Die Tetrazyklin-regulierbare Aktivierung der Genexpression

Die Anwendung des Tet-Systems erlaubt eine stringente und reversible Kontrolle der Transkription eines beliebigen Gens in eukaryotischen Zellen. In Abhängigkeit von der Effektorkonzentration können nicht nur „An/Aus“-Situationen, sondern auch intermediäre Expressionsniveaus eingestellt werden. Das System wurde in zwei Varianten (tTA und rtTA-System) entwickelt, die im Hinblick auf die Induktion durch Tetrazyklin(e) ein gegensätzliches Regulationsverhalten zeigen. Im Folgenden werden die zwei Versionen des Tet-Systems kurz vorgestellt.

#### 1.2.3.1 Das tTA-System

Um den Tet-Repressor zur Aktivierung der Transkription in Säugerzellen verwenden zu können, wurde an das C-terminale Ende des Moleküls die 128 Aminosäuren umfassende carboxy-terminale Transaktivierungsregion von VP16 fusioniert (siehe Abb. 3A). Das VP16-Protein gilt als einer der stärksten bekannten Transkriptionsaktivatoren (Sadowski *et al.*, 1988) und stammt aus dem *Herpes simplex* Virus (Triezenberg *et al.*, 1988). In dem Fusionsprotein bleiben die DNA-Bindungseigenschaften des Repressor-Anteils erhalten, wodurch ein chimärer, Tetrazyklin-kontrollierbarer Transaktivator (tTA) entstand. Durch die Bindung von tTA an synthetische RNA-PolymeraseII-Minimalpromotoren ( $P_{tet}$ , Abb. 3) können diese in ihrer Aktivität sehr effizient stimuliert werden.

Die Minimalpromotoren, die in unserem Labor entwickelt wurden, sind vom Promotor der unmittelbar frühen Gene des humanen Cytomegalovirus ( $P_{hCMV}$ , Boshardt *et al.*, 1985) und vom Promotor des Herpes Simplex Virus Thymidinkinase Gens ( $P_{Tk}$ , Nordeen, 1988) abgeleitet. Die Anwendung in transgenen Mäusen beschränkt sich bislang allerdings auf die CMV-Konstrukte, weshalb ich im Folgenden nur darauf näher eingehen will. Um eine möglichst geringe eigene Aktivität zu erhalten, wurde  $P_{hCMV}$  auf 128 Bp verkürzt (Position -53 bis +75 relativ zum Startpunkt der Transkription). Für die tTA-induzierte Aktivierung wurden am 5'-Ende heptamere *tetO*-Sequenzen eingesetzt, dieser Promotor wird im Folgenden als  $P_{tet}$ -1 bezeichnet (siehe Abb. 3 B).

Der Tetrazyklin-kontrollierbare Transaktivator tTA bindet an  $P_{tet}$ -1 nur in Abwesenheit des Effektors, während die Anwesenheit von Tetrazyklin die Bindung verhindert. Die Aktivität eines Gens unter der Kontrolle eines rtTA/tTA-abhängigen Promotors kann in stabil



transfizierten Zell-Linien um mehr als fünf Größenordnungen reversibel reguliert werden (Gossen & Bujard, 1992). Die *in vivo*-Anwendungen (mit diversen Modifikationen) reichen von einfachen Organismen wie *S. cerevisiae* oder *Dictyostelium*, *Toxoplasma Gondii*, Pflanzen wie *Arabidopsis* über *Drosophila* bis hin zu Mäusen, Ratten oder Primaten.

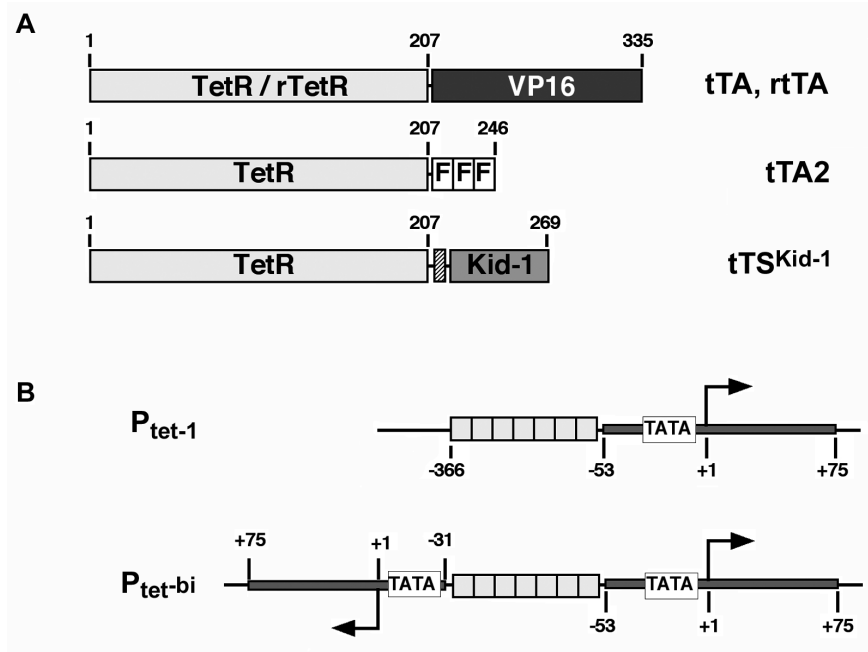


Abb. 3: Schematische Darstellung der Komponenten der Tet-Systeme

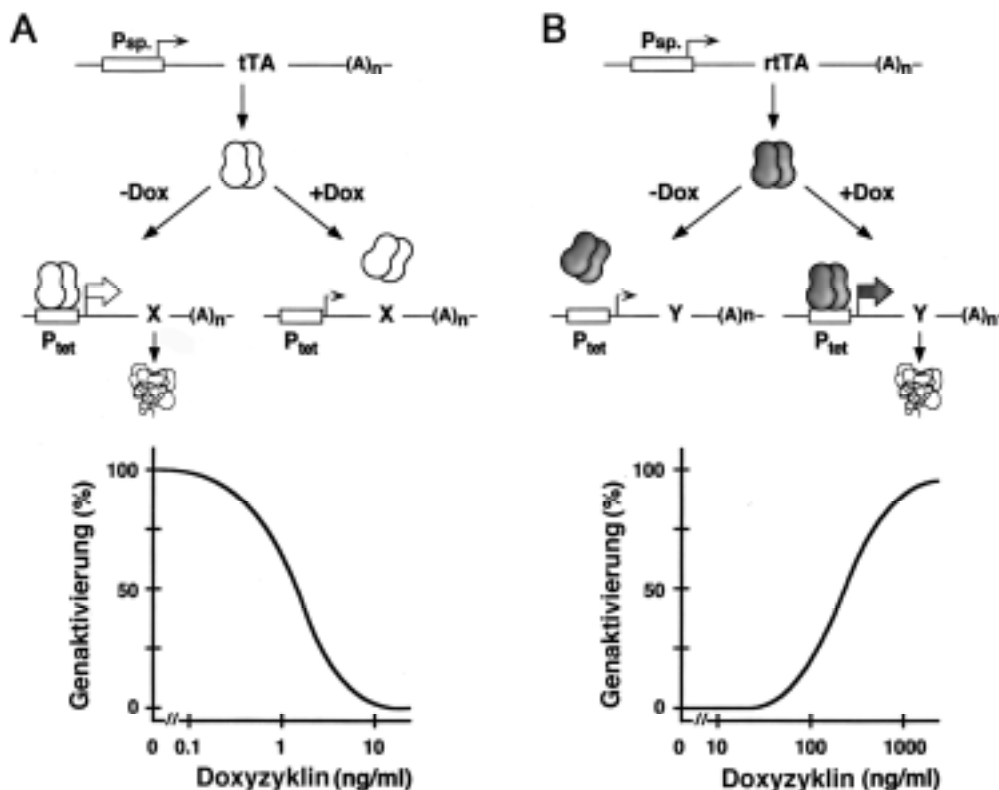
### 1.2.3.2 Das (reverse) rtTA-System

Im tTA-System wird die Genexpression durch Zugabe von Tetracyclin(en) inaktiviert und umgekehrt führt die Entfernung des Effektors zur Reaktivierung der Transkription. Dieser Prozess kann in der Zellkultur innerhalb weniger Stunden erfolgen. In der Maus ist die Aktivierung des Systems jedoch relativ langsam, da man auf die Entfernung des Antibiotikums aus einem komplexen Organismus angewiesen ist. Die Kinetik der Gen-Aktivierung über tTA ist daher in der Maus von einer Vielzahl von Parametern, wie z.B. der Dauer und Konzentration der Induktor-Gabe abhängig. Will man ein Gen über längere Zeiträume, z.B. während der Embryonalentwicklung, inaktiv halten, kann es durch die lang andauernde Behandlung mit dem Antibiotikum zu einer Depotbildung in Fettgeweben und Knochen kommen, was eine Reaktivierung des Systems verlangsamt. Für viele biologische Fragestellungen ist es aber wichtig, die Aktivität eines Gens innerhalb eines kurzen Zeitraumes induzieren zu können. Dies war der Grund für die Entwicklung eines „reversen“

Tet-Systems (Gossen *et al.*, 1995). In einem solchen Genregulationssystem sollte erst die Zugabe des Effektors die Transkription eines Gens bewirken, denn die Sättigung eines Systems mit einem Induktor kann in einem kurzen Zeitraum erreicht werden.

Die Basis des reversen tTA-Systems ist eine TetR-Mutante, die nur bei Anwesenheit von Doxzyklin (Dox) in der Lage ist, an *tetO* in entsprechenden Minimalpromotoren zu binden. Das rtTA-System lässt sich so durch die Gabe von Tetrazyklinen um mehrere Größenordnungen reversibel aktivieren. Die Funktion des reversen Tetrazyklin-regulierbaren Genexpressionssystems wurde in Zellkulturen (Gossen *et al.*, 1995) und transgenen Mäusen (Kistner *et al.*, 1996) demonstriert.

Somit stehen zwei komplementäre Tetrazyklin-regulierbare Genexpressionssysteme zur Verfügung, mit denen die Aktivität eines Gens in Abhängigkeit von der experimentellen Fragestellung entweder durch Zugabe von Tetrazyklinen inaktiviert (tTA-System) oder aktiviert (rtTA-System) werden kann (siehe Abb. 4)



**Abb. 4: Schematische Darstellung der beiden Tet-Systeme** (Baron & Bujard, 2000)

A tTA-System: Der Tetrazyklin-regulierbare Transaktivator (tTA) ist eine Fusion aus dem Tet-Repressor (TetR) des Tn10 Tetrazyklin-Resistenzoperons aus *E. coli* und den carboxy-terminalen Transaktivierungsdomänen des VP16-Proteins aus *Herpes simplex* Virus. Das tTA-Gen steht unter der transkriptionellen Kontrolle eines geeigneten Promotors ( $P_{sp.}$ ). In Abwesenheit des Effektormoleküls Doxzyklin (Dox) bindet tTA an multiple *tetO*-Sequenzen, die oberhalb eines Minimalpromotors (TATA)

positioniert sind, und aktiviert dadurch die Transkription eines Gens X. Die Anwesenheit von Dox führt zu einer Konformationsänderung der TetR-Domäne, was die Interaktion mit den Bindungsstellen des Promotors verhindert. Der Promotor wird dadurch inaktiviert.

**B rtTA-System:** Im Repressoranteil des Transaktivators sind Mutationen eingefügt, was zu einem reversen Bindungsverhalten führt (rtTA). Dieses Molekül benötigt die Effektorsubstanz Doxyzyklin, um an Tet-Operatoren binden zu können. Bei diesem Expressionssystem wird die Transkription eines Gens Y durch die Zugabe von Dox stimuliert.

### 1.2.3.3 Weiterentwicklungen des Tet-Regulationssystems

Die Komponenten des Tet-Systems wurden in den letzten Jahren in unserem Labor kontinuierlich weiterentwickelt. Durch die Modifikation der viralen VP16-Domäne konnte z.B. eine Reihe von neuen Transaktivator-Proteinen erzeugt werden, die sich in ihrem transkriptionellen Potential um mehr als 1000fach voneinander unterscheiden. Hierbei wurde das virale Protein durch mehrere nur 13 Aminosäuren umfassende, minimale Aktivierungsdomänen ersetzt (Baron *et al.*, 1997, siehe auch Abb. 3A). Diese Transaktivator-Derivate werden in größeren intrazellulären Mengen toleriert, obwohl sie über das gleiche Aktivierungspotential wie tTA verfügen. Die Modifikation scheint sich außerdem auch positiv auf die intrazelluläre Stabilität des Transaktivatormoleküls auszuwirken.

Um die Transkription der Transaktivatoren zu verbessern, wurde ihre DNA-Sequenz in den Expressionsvektoren an die in eukaryotischen Zellen vorwiegend benutzten Aminosäure-Codons angepasst, ohne die Aminosäureabfolge zu verändern. Gleichzeitig wurden auch durch eine zielgerichtete Suche in Hefe neue Transaktivator-Mutanten entdeckt, was zu einer neuen Generation von reversen Transaktivatoren führte. Diese Moleküle werden mit rtTA2<sup>S</sup>-S2 bzw. rtTA2<sup>S</sup>-M2 bezeichnet (Urlinger *et al.*, 2000). Sie verfügen im Vergleich zu rtTA über ein höheres Regulationspotential und eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber dem Induktor Doxyzyklin, wobei die rtTA2<sup>S</sup>-M2-Version die höchste Sensitivität besitzt.

Eine weitere Modifikation des Tet-Systems sind Tetrazyklin-kontrollierbare „Silencer“ (tTS). Durch Fusion des bakteriellen Tet-Repressors mit reprimierenden Domänen von eukaryotischen Transkriptionsfaktoren (z.B. KRAB aus dem humanen Nierenprotein Kid-1, Witzgall *et al.* 1994, siehe Abb. 3A) wurde in unserem Labor ein auf P<sub>tet</sub> negativ wirkender Transkriptionsfaktor entwickelt (Freundlieb *et al.*, 1999). In Kombination mit rtTA kann so die Aktivität von P<sub>tet</sub> in Abhängigkeit von Tetrazyklin nicht nur induziert, sondern zusätzlich auch aktiv reprimiert werden. Dadurch kann die Basalaktivität von Tc-induzierbaren Promotoren z.B. auch in transgenen Mäusen reduziert werden, die in manchen genomischen Integrationsorten vorliegt (Zhu *et al.*, 2001).

Nicht nur das TetR-Fusionsprotein war Gegenstand von Modifikationen, sondern auch der Tc-induzierbare Promotor. Zur Generierung von transgenen Mauslinien war vor allem eine Entwicklung wichtig - die Herstellung von bidirektionalen Expressionseinheiten ( $P_{tet} bi$ , siehe Abb. 3B). Sie erlauben eine regulierte Expression von zwei Genen gleichzeitig (Baron *et al.*, 1995). In diesen Konstrukten sind zwei Minimalpromotoren in entgegengesetzter Richtung um sieben zentrale Tet-Operatoren orientiert, die so gemeinsam durch tTA oder rtTA aktiviert werden können. Mit diesen Promotoren ist es möglich, die Transkription eines Reportergens (z.B. Luziferase,  $\beta$ -Galaktosidase oder GFP) gemeinsam mit dem Zielgen zu regulieren. Werden solche  $P_{tet} bi$ -Konstrukte in transgenen Mäusen eingesetzt, wird eine initiale funktionale Charakterisierung von neuen Mauslinien erleichtert, vor allem wenn es sich bei dem Produkt des Zielgens um ein schwer zu detektierendes Protein handelt. Durch die Verwendung des Enzyms Luziferase als Reporter kann man so leicht eine quantitative Vorstellung über das Regulationsfenster der Genexpression in Abhängigkeit des Induktors bekommen. Reportergene wie *lacZ* oder GFP erlauben die Analyse des Expressionsmusters *in situ* auf Einzelzellebene. Wie in dieser Doktorarbeit gezeigt werden wird, eignet sich das Luziferase-Gen auch als nicht-invasiver Marker zum Nachweis von Genaktivitäten *in vivo* in der Maus.

Gegenstand der Forschung in unserem Labor sind weiterhin neue Tetrazyklin-Derivate, die in der Zellkultur und in transgenen Mäusen in gleicher Dosierung wie Doxzyklin eine höhere Induktion auslösen. Für eine effiziente Induktion des reversen Systems im Gehirn von Mäusen scheint dies notwendig zu sein.

#### ***1.2.3.4 Etablierung des Tet-Systems in transgenen Mäusen: grundsätzliche Überlegungen und Limitierungen***

Zur Untersuchung einer spezifischen Fragestellung in transgenen Mäusen mit dem Tet-System ist es erforderlich, zwei getrennte Mauslinien herzustellen. Eine Mauslinie trägt das Zielgen unter einem Tet-kontrollierbaren Promotor, die zweite trägt die tTA/rtTA-Expressionskassette unter dem Promotor der Wahl. Durch die Verpaarung der beiden Mauslinien ist so eine hochspezifische zeitliche und räumliche Kontrolle der Genaktivität in doppelt transgenen Nachkommen möglich (Kistner *et al.*, 1996).

Oft wurde versucht, den Aufwand, der zur Generierung von zwei getrennten Mauslinien notwendig ist, zu reduzieren. Dies wäre z.B. durch Konstrukte möglich, die beide Elemente tragen (Utomo *et al.*, 1999) oder durch die Kointegration der tTA/rtTA-Expressionseinheit

zusammen mit dem Zielgen unter Kontrolle des  $P_{tet}$ -1. Diese Versuche waren nur selten erfolgreich (Soulie *et al.*, 1999; Neuhold *et al.*, 2001), da vermehrt „Position-effect variegation“ (PEV, Wilson *et al.*, 1990) oder eine unregulierte Basalexpression des Zielgens beobachtet wurde (Valencik & McDonald, 2001, Zhu *et al.*, 2001). Der Grund dafür ist vermutlich die direkte Aktivierung von  $P_{tet}$  durch Enhancer-Sequenzen in den tTA/rtTA-Promotoren. Es ist ein allgemein bekanntes Phänomen, dass die örtliche Nähe von zwei Expressionseinheiten in einem genomischen Locus zu gegenseitiger Beeinflussung führen kann (Eszterhas *et al.*, 2002, Hasegawa & Nakatsuji, 2002).

#### 1.2.3.4.1 Herstellung von tTA/rtTA-Mauslinien

Zur Herstellung von transgenen Mauslinien, die Transaktivatorproteine synthetisieren, gibt es grundsätzlich zwei Möglichkeiten: die pronucleare Mikroinjektion der Expressionseinheiten in befruchtete Eizellen, was zu einer zufälligen Integration in das Mausgenom führt, oder durch einen „Knock-in“ der Konstrukte in einen bestimmten genomischen Locus durch die ES-Zelltechnik.

Durch das gezielte Ansteuern eines chromosomalen Locus kann die Transaktivator-cDNA unter die Kontrolle von endogenen Promotoren gestellt werden (Bond *et al.*, 2000). Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass so das natürliche Expressionsmuster dieses Promotors erhalten bleibt, wobei seine Aktivität z.B. hoch spezifisch für bestimmte Entwicklungsstadien oder auf wenige Zelltypen beschränkt sein kann. Ein Nachteil bei dieser Methode ist, dass die Expressionsstärke des Promotors vorgegeben ist, d.h. sie kann z.T. zu schwach oder zu stark für eine optimale Expression der Transaktivatoren sein. Eine Lösung dieses Problems könnte hier die Verwendung von Transaktivatoren mit unterschiedlichem Aktivierungspotential bieten (Baron *et al.*, 1997).

Einfacher und schneller können Transaktivator-Mauslinien allerdings durch die Mikroinjektion von Plasmidkonstrukten hergestellt werden. Ein weiterer Vorteil dieser Methode besteht darin, dass es durch die zufällige Integration der tTA/rtTA-Expressionseinheiten zu einer automatischen Selektion auf Loci kommt, in denen die Expressionshöhe der Transaktivatoren keinen wesentlichen Einfluss auf zelluläre Gleichgewichte der basalen Transkriptionsfaktoren besitzt. So können Mauslinien gefunden werden, die ein optimales „Konzentrationsfenster“ an Transaktivatormolekülen besitzen. Weiterhin können Promotoren durch den chromosomalen Einfluss der Integrationsstelle auch

interessante artifizielle Spezifitäten bekommen, die zur Untersuchung von bestimmten Fragestellungen sehr nützlich sein können.

Die meisten zufälligen Integrationsorte bieten allerdings keine optimale Sequenzumgebung zur ektopischen Expression von Transgenen. Die Erfahrung zeigt, dass nur etwa 10-20% der Stammtiere (je nach Konstrukt) eine funktionale Expression des Transaktivator-Gens vermitteln. In den restlichen Linien werden entweder keine ausreichenden Transaktivator-Konzentrationen erreicht oder das Expressionsmuster unterliegt Positionseffekten (al-Shawi *et al.*, 1990, Robertson *et al.*, 1995).

Eine attraktive neue Alternative zur Herstellung von tTA/rtTA-transgenen Mauslinien ist die Verwendung von großen genomischen Fragmenten, die in BAC oder YAC-Vektoren integriert sind (Perea *et al.*, 2001). Durch die Verwendung von ausreichend großen DNA-Fragmenten als Transgen in der Maus wurde festgestellt, dass die spezifischen Eigenschaften eines Locus in ein anderes genomisches Umfeld übertragen werden können (eine Übersicht dazu findet sich z.B. in Montoliu, 2002). So konnte z.B. durch den Transfer von BACs/YACs mit großen regulatorischen Sequenzen das endogene Expressionsmuster des Tyrosinase-Gens (Schedl *et al.*, 1993), des  $\beta$ -Globin Locus (Gaensler *et al.*, 1993) oder des  $\alpha$ -Lactalbumin-Gens (Stinnakre *et al.*, 1999) rekapituliert werden. Man nimmt an, dass sich auf den BACs alle wichtigen regulatorischen Elemente befinden, die zu einer integrationsunabhängigen und gewebespezifischen Expression des Transgens notwendig sind. Die Techniken zur Klonierung und Veränderung von BACs sind in den letzten Jahren stetig weiterentwickelt worden (Lee *et al.*, 2001; Copeland *et al.*, 2001), sodass die Expression von Transaktivator-Genen durch genomische Kontrollelemente, die in BACs lokalisiert sind, im Prinzip kein Problem mehr darstellen sollte (z.B. Radomska *et al.*, 2002).

#### 1.2.3.4.2 Herstellung von transgenen Mäusen mit Tet-regulierten Expressionseinheiten

Zur Etablierung von Mauslinien mit Tet-regulierten Expressionskassetten ( $P_{tet}$ -1 oder  $P_{tet}$ -bi) wurde bislang vor allem die Methode der Mikroinjektion angewendet. Nach der zufälligen Integration wird aber auch hier eine starke Locus-Abhängigkeit beobachtet. In den meisten genomischen Loci ist keine oder nur eine schwache Induktion des Transgens möglich. Es ist anzunehmen, dass in diesen Fällen  $P_{tet}$ -1 oder  $P_{tet}$ -bi kontrollierte Transkriptionseinheiten in heterochromatisierte Bereiche des Genoms integriert sind, wodurch eine effektive Aktivierung durch tTA bzw. rtTA verhindert wird. Teilweise wird eine regulierte Expression aber auch durch eine konstitutive Basalexpression des Zielgens, die durch den lokalen Einfluss von Enhancern an der Integrationsstelle ausgelöst wird, negativ beeinflusst (Kistner, 1996; Schwenk *et al.*, 1995; Zhu *et al.*, 2001). Statistisch lässt sich deshalb ein Transgen in

nur einer aus ca. fünf Linien durch die Verpaarung mit einer Transaktivator-Linie hoch induzieren, bei gleichzeitig geringer Basalaktivität. Dies verdeutlicht, dass die Identifikation und Charakterisierung einer funktionalen Mauslinie ein langwieriger und aufwändiger Prozess ist. Genomische Loci, in denen eine quantitative Regulation eines Tet-kontrollierten Transgens möglich ist - d.h. minimale Basalaktivität im nicht-induzierten Zustand und hohe Aktivierung nach Induktion- wurden von uns als „still, aber aktivierbar“ (S/A) bezeichnet.

Bislang sind noch keine genomischen Loci bekannt, die generell eine Tet-kontrollierte Regulation von Zielgenen unterstützen. Aus diesem Grund wurde die Herstellung von induzierbaren Mauslinien mit Hilfe der homologen Rekombination in ES-Zellen nur in wenigen Fällen durchgeführt. In diesen Experimenten wurde das endogene wt-Gen durch eine Tet-regulierte Version ersetzt (Shin *et al.*, 1999; Bond *et al.*, 2001). Dieser Strategie setzt allerdings eine DNA-Struktur voraus, in der der endogene Promotor direkt keinen Einfluss auf  $P_{tet}$ -1 oder  $P_{tet}$ -bi ausüben kann.

Trotz des experimentellen Aufwands konnten seit der Etablierung des Tet-Systems in Mäusen über 40 Mauslinien hergestellt und charakterisiert werden, die in den unterschiedlichsten Zelltypen die Expression von tTA/rtTA erlauben (Schönig & Bujard, 2002). In der gleichen Zeit wurden auch mehr als 80 Linien mit Tet-regulierten Zielgenen etabliert (Berger & Bujard, 2003). Die Kombination dieser beiden Tet-Mausfamilien eröffnet zunehmend die Möglichkeit, die gleichen Zielgene in vielen verschiedenen Geweben reversibel zu exprimieren - ohne dass neue Mauslinien hergestellt werden müssen - und erlaubt so eine differenzierte Analyse von Genfunktionen. Die Anwendung des Tet-Systems in transgenen Mäusen hat z.B. einen wichtigen Beitrag dazu geleistet, Mechanismen der Embryonalentwicklung oder Gedächtnisausbildung zu verstehen (Mayford *et al.*, 1996; Shin *et al.*, 1999). Insbesondere konnten auch Mausmodelle für humane Krankheiten, wie z.B. Typ 1 Diabetes (Christen *et al.* 2002), Chorea Huntington (Yamamoto *et al.*, 2000) oder Herzkrankheiten (z.B. Lee *et al.*, 1998; Beggah *et al.*, 2002) und zur Krebsentstehung (z.B. Felsher & Bishop, 1999; Berkovich & Efrat, 2001) etabliert werden. In diesen Modellen war es nicht nur wichtig, die Expression des Transgens während der Entwicklung zu unterdrücken und erst im adulten Tier zu aktivieren, sondern auch die Möglichkeit zu besitzen, das Zielgen an- und wieder auszuschalten. So konnte nicht nur die Induktion des Krankheitsbildes, sondern auch dessen mögliche Regression im jeweiligen Modell studiert werden.

## 1.3 Zielsetzung der Arbeit

### 1.3.1 Herstellung einer leberspezifischen rtTA-Linie und Analyse der Tet-regulierten Genexpression in der LC-1-Linie

In einer Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Rajewski, Universität Köln, wurden von Frieder Schwenk transgene Mäuse erzeugt, die das Reportergen Luziferase gemeinsam mit der Cre-Rekombinase-cDNA unter der Kontrolle eines Tetrazyklin-kontrollierbaren Promotors ( $P_{tet}$ ) tragen. Durch Verpaarung dieser Mäuse mit Transaktivator-produzierenden Tieren sollte eine gewebespezifisch induzierbare Rekombination möglich sein.

In Vorexperimenten hatte Frieder Schwenk eine Mauslinie identifiziert, in der sich die Expression der beiden Gene sehr gut durch das Tet-System regulieren ließ (Schwenk, Dissertation Universität Köln, 1997). Diese Linie, im Folgenden als LC-1 (Luziferase, Cre) bezeichnet, sollte im ersten Teil der Doktorarbeit näher analysiert werden.

Zur Untersuchung der Rekombinations-Induktion durch die LC-1-Linie eignet sich aus oben genannten Gründen das rtTA-System besser als das tTA-System. Darüber hinaus ist die Expression der Rekombinase nur für kurze Zeit notwendig. Zu Beginn der Doktorarbeit stand zur weiteren Analyse der LC-1-Linie jedoch nur eine rtTA-Mauslinie zur Verfügung, in der die Expression des Transaktivator-Gens unter der Kontrolle des humanen CMV-Promotors ( $P_{hCMV}$ ) stand. Dieser vermittelt in verschiedenen Geweben ein unterschiedlich starkes Transkriptionssignal und unterliegt starken Positionseffekten (Kistner *et al.*, 1996). Für eine Untersuchung der Cre-vermittelten Rekombination auf zellulärer Ebene ist diese Mauslinie folglich weniger geeignet. Aus diesem Grund sollte eine neue rtTA-Linie mit gewebespezifischer Expression hergestellt werden. Durch die Verwendung eines leberspezifischen Promotors konnte in unserem Labor bereits eine Mauslinie hergestellt werden, die eine homogene Genexpression ohne PEV in Hepatozyten zeigt (Linie TA<sup>LAP</sup>-1, Kistner *et al.*, 1996). Dieser Promotor sollte zur Expression des reversen Transaktivators in Hepatozyten der Maus eingesetzt werden.

Transgene Mäuse, die eine stringente Regulation von Genfunktionen in Hepatozyten ermöglichen, sind in unserem Labor aus verschiedenen Gründen von Interesse. In Zusammenarbeit mit Prof. Gebhardt und seiner Gruppe ist es z.B. ein Fernziel, konditional proliferierende Hepatozyten-Kulturen zu etablieren, die eine Vielzahl von experimentellen Fragestellungen zugänglich machen würden. Insbesondere wäre zu hoffen, dass in derartigen langlebigen Primärkulturen Infektionen mit Leberstadium-spezifischen Malariaparasiten



möglich werden, um die Differenzierung der Parasiten vom Sporozoit zum Merozoit zu studieren.

Aber auch andere Lebererkrankungen wären in einem solchen System angebar, wie unsere Kollaborationen mit Prof. Gebhardt zur Leberfibrose bzw. mit Frau Priv. Doz. Protzer zur Interferenz mit Hepatitis B-Infektionen zeigen.

Die Leber bietet sich ebenfalls an als ein Organ, an dem mechanistische Studien zur Tet-Regulation durchgeführt werden können. Insbesondere sollten im Rahmen meiner Arbeit Fragen zur Induktionskinetik, zur Reproduzierbarkeit von An- und Abschaltvorgängen und zu Positionseffekten der Genaktivität (PEV) untersucht werden. Für einige dieser Untersuchungen war es eine Voraussetzung, Tet-regulierte Genaktivitäten am lebenden Tier, d.h. nicht-invasiv, zu verfolgen. Hierzu sollte ein auf Biolumineszenz von Luziferase basierendes System in unserem Labor aufgebaut werden.

Mit Hilfe der zu erwartenden rtTA-Mauslinie sowie mit anderen tTA-Mausstämmen sollte die LC-1-Maus auf verschiedene Parameter hin untersucht werden, von denen die folgenden am wichtigsten erschienen:

- Stringens der Regulation
- Aktivierbarkeit in verschiedenen Geweben/Zelltypen
- Kinetik der Induktion und des Abschaltvorgangs
- Positionseffekte
- Reproduzierbarkeit der Induktion über die Zeit
- Vergleich der Transkriptionsintensität der beiden unter  $P_{tet}$ -bi-stehenden Gene
- Eignung der LC-1-Maus als „regulierte Cre-Linie“ für die generelle Eliminierung von *loxP*-flankierten DNA-Fragmenten *in vivo*.

Für den Fall, dass die LC-1-Linie bezüglich dieser Parameter als geeignet erscheint, sollte der genomische LC-1-Locus näher charakterisiert werden.

### 1.3.2 Klonierung und Analyse eines S/A-Locus

Eine Limitierung bei der Etablierung des Tet-Systems in komplexen transgenen Organismen liegt in der Abhängigkeit der Kontrolle des Zielgens vom genomischen Locus, in den die Tet-regulierte Expressionskassette integriert ist. Das Ziel des zweiten Teils dieser Arbeit ist es, einen Weg aus dieser Abhängigkeit zu finden. Können Loci im Mausgenom identifiziert werden, die erlauben, Tet-Regulation in voraussagbarer Qualität und effizienter Weise zu etablieren ?

Zur Bearbeitung dieser Fragestellung haben sollte die folgende Strategie angewendet werden: Identifizierung einer Integrationsstelle, in der ein  $P_{tet}$ -kontrolliertes Zielgen „perfekt“ reguliert wird, d.h. Auffinden eines „stillen, aber aktivierbaren“ (S/A)-Locus. Mit dieser Information kann der entsprechende Locus durch homologe Rekombination in ES-Zellen angesteuert werden. Ein solcher S/A-Locus kann aber auch als großes DNA-Fragment isoliert werden. Es ist dann zu überprüfen, ob es gelingt die S/A-Locus-Eigenschaften direkt in die Keimbahn von Tieren durch Pronukleusinjektion von entsprechender DNA zu übertragen.

Beide Strategien haben die Identifizierung eines S/A-Locus einer transgenen Maus zur Voraussetzung. In einigen Mauslinien funktioniert die Regulation des Transgens durch das Tet-System besonders effizient. Kandidaten zur Isolierung des Locus waren aus diesem Grund die Mauslinien L7 (Kistner *et al.*, 1996), LC-1 (Schwenk, 1997) und tet-DTA (Lee *et al.*, 1998). Von der L7 und der LC-1 Linie war bekannt, dass sie im nicht-induzierten Zustand kaum messbare Luziferase-Aktivitäten zeigten. Nach Induktion über tTA oder rtTA ließ sich jedoch in verschiedenen Organen eine hohe Expression erreichen. Die tet-DTA-Linie trägt ein Tet-reguliertes Diphtheria Toxin A (DTA)- Gen, was bedeutet, dass hier der Locus extrem dicht reguliert sein muss, denn schon eine minimale Expression des Toxins führt zum Zelltod.

Unsere Entscheidung zur Charakterisierung eines S/A-Locus fiel auf die LC-1-Linie, nachdem sich durch Daten, die ich im ersten Teil meiner Arbeit erhalten hatte, sehr günstige Eigenschaften dieser Mauslinie ergaben.

Der LC-1-Locus sollte daher auf einem möglichst großen DNA-Fragment kloniert werden. Um zu überprüfen, ob sich ein solches Fragment zur Übertragung der günstigen Eigenschaften des Locus in die Maus eignet, sollten LC-1-Tiere der „zweiten Generation“ durch Pronukleusinjektion entsprechender DNA hergestellt und charakterisiert werden.

Zur experimentellen Verwirklichung wurden zwei Vorgehensweisen ins Auge gefasst: die Klonierung des LC-1-Locus entweder als „yeast artificial chromosome“ (YAC, Burke *et al.*, 1987) oder als „bacterial artificial chromosome“ (BAC, Shizuya *et al.*, 1992). Beide Methoden erlauben es, DNA-Fragmente bis zu einer Größe von mehreren hundert Kb zu klonieren. Nach Vorarbeiten haben wir uns für das BAC-System entschieden, was - wie im Folgenden beschrieben wird - nicht nur zur Isolierung des LC-1-Locus führte, sondern auch in der Tat einen S/A-Locus zugänglich machte, der die erhofften Eigenschaften aufweist.

## 2. Materialien

### 2.1 Laborausstattung

Analytische Waage AE 163 und HK 60	Mettler AG, Greifensee, Schweiz
Analytische Waage Typ 1712	Satorius GmbH, Göttingen
Automatisiertes Mikroinjektionssystem	Carl Zeiss, Oberkochen
CCD-Kamerasystem, Series 200	Hamamatsu Photonics, Herrsching
CO <sub>2</sub> -Inkubationsschrank Mod. 6000	Heraeus GmbH, Hanau
Computer-Hardware	Computer Theile, Speyer
Apple Computer, iBook	Computer Theile, Speyer
Apple Computer PowerPCs	Systematics, Frankfurt
Farbdrucker Epson, StylusPhoto	Systematics, Frankfurt
Farbdrucker Epson, Stylus 3000	Systematics, Frankfurt
Drucker Lexmark Optra S 1855	Systematics, Frankfurt
Scanner Linoscan 1400	Heidelberger Druck, Heidelberg
Computer-Software	Adobe Systems Inc. USA
Adobe Photoshop	Deneba Software Inc., Miami, USA
Canvas 7	Commisariat a l'Energie Atomique, France
DNA Strider 1.3	Microsoft Corporation, CA, USA
ExcelMAC 2001	Molecular Dynamics GmbH, Krefeld
Image Quant Vs 1.1	Fuji Photo Film Co., Ltd., Japan
MacBAS 2.0	Scientific Inc. USA
MacPlasmap 2.0.5	Microsoft Corporation, CA, USA
WordMAC 2001	Netscape Communications Corp., USA
Netscape Navigator 6	Microsoft Corporation, CA, USA
Powerpoint 2001	Olympus, Hamburg
Digital-Kamera Olympus DP 10	ZMBH, Heidelberg
Elektroelutionsapparaturen	
Elektrophoreseapparaturen:	
Elektrophoresis Constant Power Supply ECPS 3000/150	Pharmacia GmbH, Freiburg
Elektrophoresis Power Supply PS143 500V/400mA	EMBL, Heidelberg
Pulsed Field Elektrophoresis System CHEF-DR III	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
FluoroImager SI	VISTRA DNA-Systems
Fluoreszenzmikroskop	Leica RMDX, Leica Bensheim
Gefrier-Mikrotom Frigocut N 2800	Reichert-Jung, jetzt Leica, Bensheim
Geigerzähler Minimonitor GM meter 5.10	Wellhoer Kernphysik, Schwarzenbach
Geigerzähler LB 1210 B	Berthold GmbH, Wildbad
Geltrockner Modell 1125 B	Biorad, München
Gene Pulser, Pulse Controller, Küvetten	Biorad, München
Gilson Pipetman 2, 10, 20, 200, 1000	Gilson Medical Electronics, Villiers-Le-Bel, Frankreich
Grobwaage Typ 1474	Mettler, Göttingen
Hybridisierungssofen MKII	Hybaid, Middlesex, Großbritannien
Inkubationsschrank Typ VT 5050 EK	Heraeus Christ AG, Zürich, Schweiz
Inversmikroskop Diavert	Leitz GmbH, Wetzlar
Inversfluoreszenzmikroskop	Leica DM IRBE, Leica Bensheim
Kassetten für die Autoradiographie	Goos, Heidelberg
Kleinbildkamera OM 10	Olympus
Kolonien-Pick-Roboter Q-Pix	Genetix Limited, Hampshire, England
Kryostat	Reichert-Jung
Kühlzentrifuge Sorvall RC-5B mit den Rotoren	
GS3, GSA, SA600, SS34, SM24, HB4	DuPont Company, USA
Labor pH-Meter	Knick GmbH, Göttingen
Lumat, Typ LB 9501	Berthold GmbH, Wildbad

Makroskop Leica M420  
 Mehrkanal-Pipette, 1-10µl, 5-50µl  
 Mehrkanal-Pipette, elektronisch 15-1200µl  
 Mikrowellenofen Cooktronic  
 Mikrowellenofen MW 711 G  
 Netzgerät ECPS 3 000/150  
 Netzgerät PS 143  
 PhosphoImager BAS1000  
 Phosphoimager-Kassetten+Screens  
 Reinluftwerkbank  
 Roboter zum Picken und Transfer von Bakterienklonen  
 Schüttler Eppendorf 5432  
 Schüttelinkubator für Bakterien ISF-1-W/V  
 Speed-Vac-Concentrator Savant  
 Spektralphotometer, Ultraspec 3000  
 Stickstofftank BT 40  
 Szintillationsspektrometer LS6000IC  
 Thermocycler RoboCycler  
 Tischkühlzentrifuge Microrapid/K  
 Tischzentrifuge, Biofuge A  
 UltraTurrax T25  
 Ultrazentrifuge L8-70M  
 Ultrazentrifuge TL-100 mit den Rotoren  
 TL-100, -100.1, -100.2, -100.3  
 UV-Transilluminator  
 Vakuum-Pumpensystem BVC21  
 Videodokumentation Cybertech CS1  
 Wasserbäder Julabo3

Leica, Bensheim  
 Capp, über Servichem GmbH, Bischweier  
 Matrix Technologies, Lowell, USA  
 Philips AG  
 Electronia  
 Pharmacia, Dübendorf, Schweiz  
 EMBL, Heidelberg  
 Fuji Photo Film Co., Ltd., Japan  
 Fuji Photo Film Co., Ltd., Japan  
 ESG Reinraumtechnik  
 QPix, Genetix, München-Dornbach  
 Migge, Heidelberg  
 Kühner, Schweiz  
 Bachhofer, Reutlingen  
 Pharmacia, Biotech  
 L'Air liquide, Frankreich  
 Beckman Instruments, CA, USA  
 Stratagene  
 Hettich GmbH, Tuttlingen  
 Heraeus Christ AG, Zürich, Schweiz  
 Janke und Kunkel, Staufen  
 Beckman Instruments GmbH, München  
  
 Beckman Instruments GmbH, München  
 UVP Inc. CA, USA  
 VacuuBrand GmbH&Co., Wertheim  
 Cybertech, Berlin  
 Julabo, Seelbach

## 2.2 Verbrauchsmaterialien

Chromatographiepapier, Whatman 3MM  
 DNA-Aufreinigungssäulchen für PCR-Produkte,  
 Gel-Extraktion und genomische DNA  
 Dialyseschlauch (D-0530)  
 Elektroporationsküvetten, 2mm  
 Filterspitzen, 10µl  
 Filterspitzen, 1250µl  
 Glaspipetten  
 Gilson PolypropylenPipettenspitzen

Kanülen  
 LMS 1010 Pipettenspitzen  
 Mikro-Einmalküvetten  
 Mikro-Tubes für PCR Anwendungen  
 Mini-Dialyseeinheit Slide A Lyser 10-100µl  
 Nitrozellulose-Filter 0,025µm/25mm  
 Objektträger Superfrost Plus  
 Parafilm M, Laboratory Film  
 Pasteur-Kapillar-Pipetten  
 Pipettenspitzen mit großer Öffnung  
 Plastik-Petrischalen  
 Plastik-Spritzen  
 Plastikmaterial für die Zellkultur

Vetter, St.Leon-Rot  
  
 Qiagen GmbH, Hilden  
 Sigma  
 Equibio, über Peqlab, Erlangen  
 Micronic, Lelystad, Holland  
 Matrix Technologies, Hudson, USA  
 Brand, Wertheim  
 Gilson Medical Electronics, Villiers-Le-Bel,  
 Frankreich  
 Braun, Melsungen  
 LMS Labortechnik GmbH, Heidelberg  
 Ratiolab GmbH, Dreieich  
 ABgene, Surrey, England  
 Pierce/ Perbio Science, Bonn  
 Millipore GmbH, Eschborn  
 Menzel  
 American Can Company, Greenwich, CT, USA  
 WU, Mainz  
 Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf  
 Greiner Labortechnik GmbH  
 Becton Dickinson, Heidelberg  
 Greiner Labortechnik GmbH  
 Becton Dickinson GmbH  
 Nunc GmbH

Polystyrol-Röhrchen für Biolumat  
 Quarzglas-Küvetten  
 Reaktionsgefäße, 2ml  
 Reaktionsgefäße 1,5ml  
 Röntgenentwickler Agfa G150  
 Röntgenfilm Kodak X-Omat AR5  
 Röntgenfixierer Agfa G334  
 Spitzen mit extra großer Öffnung  
 Sterilfilter

Greiner Labortechnik GmbH  
 Hellma, München  
 Eppendorf AG, Hamburg  
 Steinbrenner Laborsysteme  
 Röntgen Bender, Gernsbach  
 Röntgen Bender, Gernsbach  
 Röntgen Bender, Gernsbach  
 Biozym Diagnostic GmbH, Oldendorf  
 Millipore GmbH, Eschbor

## 2.3 Chemikalien

Acrylamid	AppliChem, Darmstadt	Harnstoff	Serva, Heidelberg
Agar	Difco Labs, Detroit, USA	Hefeextrakt	Difco Labs, Detroit, USA
Agarose	Gibco, BRL, Eggenstein	HEPES	Gibco BRL, Eggenstein
Agarose, LMP	BMA, Rockland, USA	Hygromyzin B	Calbiochem, Bad Soden
Ampizillin	AppliChem, Darmstadt	Isopropanol	J.T.Baker, Holland
Ammoniumperoxodisulfat	Sigma, München	Kaisers Glyceringelatine	Merck, Darmstadt
Anhydrotetrazyklin	Sigma, Deisenhofen	Kernechtrot	Merck, Darmstadt
Borsäure	Merck, Darmstadt	Luziferin	AppliChem, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen	Lipofectamine	Promega, Mannheim
Chloramphenikol	Sigma, Deisenhofen	Kanamyzin	Invitrogen, Karlsruhe
Chloroform	J.T.Baker, Holland	β-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
3,3'-Diaminobenzidine (DAB)	Vector, Burlingame, USA über Linaris, Wertheim	Methanol	Merck, Darmstadt
Desoxynukleotide	Roche Diagnostics, MA	o-Nitrophenol-β-D-	J.T.Baker, Holland
Didesoxynukleotide	Roche Diagnostics, MA	Galaktopyranosid (ONPG)	AppliChem, Darmstadt
DMSO	Serva, Heidelberg	Paraformaldehyd	Riedel de Haen, Seelze
Doxyzyklin-Hydrochlorid	Sigma, Deisenhofen	Penizillin/Streptomycin	Gibco BRL, Eggenstein
DTT	Serva, Heidelberg	Phenol	Roth, Karlsruhe
EDTA	Sigma, Deisenhofen	Protein Assay Lösung	Bio-Rad, München
Einbettmedium f. Schnitte	Jung/Leica, Nussloch	RNasin	Promega, Mannheim
Essigsäure	Merck, Darmstadt	Salzsäure	J.T.Baker, Holland
Ethanol	J.T.Baker, Holland	SDS	Serva, Heidelberg
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg	Sephadex G50	Sigma, Deisenhofen
Formaldehyd	J.T.Baker, Holland	Sucrose	J.T.Baker, Holland
Formamid	Fluka, Neu-Ulm	TEMED	Serva, Heidelberg
Genetizin (G-418) Sulfat	Gibco BRL, Eggenstein	Tetrazyklin	Sigma, Deisenhofen
„Glasmilch“-Silikat S5631	Sigma, Deisenhofen	Tris	Serva, Heidelberg
Glycerin	Roth, Karlsruhe	Triton X-100	Serva, Heidelberg
Glyzin	Serva, Heidelberg	X-Gal	AppliChem, Darmstadt
		Xylencyanol	Sigma, Deisenhofen

Alle nicht aufgeführten Chemikalien waren von der Qualität p.A. und wurden von folgenden Firmen bezogen:

Acros Organics, Geel (Belgien)  
 AppliChem GmbH, Darmstadt  
 Biomol Feinchemikalien GmbH, Ilvesheim  
 Carl Roth KG, Karlsruhe  
 Difco Laboratories, Detroit Michigan (USA)  
 Fluka Feinchemikalien GmbH, Neu-Ulm  
 Gerbu Biotechnik GmbH, Gaiberg  
 Invitrogen (Gibco) GmbH, Karlsruhe  
 J.T. Baker, Deventer (Holland)  
 Merck AG, Darmstadt  
 Pharmacia Chemikalien GmbH, Dübendorf

Riedel de Haen Laborchemikalien AG, Seelze  
 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim  
 Roth Chemikalien, Karlsruhe  
 Serva Feinbiochemika GmbH & Co., Heidelberg  
 Sigma Chemikalien GmbH, Deisenhofen

## 2.4 Radioisotope

$\alpha$ [<sup>32</sup>P]-dCTP (3000 Ci/mmol)

Amersham & Buchler, Frankfurt/Main

## 2.5 Enzyme

$\beta$ -Agarase  
 DNA-Ligase aus T4

DNA-Polymerase I aus E. coli (Klenow-Fragment)  
 DNA-Polymerase aus T4  
 DNA-Polymerase aus Thermus aquaticus (Taq)

EcoRI Methylase  
 Gelase  
 Luziferase  
 Mung Bean Nuklease  
 Polynukleotidkinase aus T4  
 Proteinase K  
 Reverse Transkriptase  
 Restriktionsendonukleasen

RNase A  
 Shrimp Alkalische Phosphatase

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim  
 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim  
 New England BioLabs, Frankfurt  
 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim  
 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim  
 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim  
 Promega, Mannheim  
 Qiagen GmbH, Hilden  
 New England BioLabs, Frankfurt  
 Epicentre, Madison (USA)  
 Sigma, Deisenhofen  
 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim  
 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim  
 Qiagen GmbH, Hilden  
 Qiagen GmbH, Hilden  
 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim  
 New England BioLabs, Frankfurt  
 MBI Fermentas, St.Leon-Rot  
 Boehringer, Mannheim  
 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

## 2.6 Antikörper

Anti-Cre IgG (polyklonal) aus Kaninchenserum  
 Anti-Kaninchen-IgG, biotinyliert

Prof. G. Schütz, DKFZ Heidelberg  
 Vector Laboratories, Burlingame (USA)

## 2.7 Nukleinsäuren

### 2.7.1 Oligonukleotide und Sequenzierprimer

#### Luziferase

Sense luc1: 5' -TTA CAG ATG CAC ATA TCG AGG- 3'  
 Antisense luc2: 5' -TAA CCC AGT AGA TCC AGA GG- 3'

#### Cre

Upstream Cre #3: 5' -TCG CTG CAT TAC CGG TCG ATG C- 3'  
 Downstream Cre #4: 5' -CCA TGA GTG AAC GAA CCT GGT CG- 3'

Synthetischer TetR

synthetic tet sense: 5' -CCA TGT CTA GAC TGG ACA AGA- 3'  
synthetic tet antisense: 5' -CTC CAG GCC ACA TAT GAT TAG- 3'

tetR (tTA/rtTA)

tet sense: 5' -AAT GAG GTC GGA ATC GAA GG- 3'  
tet antisense: 5' -TAG CTT GTC GTA ATA ATG GCG G- 3'

LacZ

LacZ 5': 5' -TTA CGA TGC GCC CAT CTA CAC- 3'  
LacZ 3': 5' -TTA CCC GTA GGT AGT CAC GCA- 3'

E11 flankierende Regionen

E11 SLIM 1: 5' -CTA GGC GGC CGC GAA TTC AAA TG- 3'  
E11 genomic 2: 5' -CCA GGC AGT AGG GAT GGC TCA A- 3'

E11 SLIM 3: 5' -GGT AAT GCG GCC GCG AAT TCC TT- 3'  
E11 genomic 4: 5' -GTC TCC TAG AAA AGT GCA TGA CT- 3'

Sequenzierprimer E11

hGH : 5' -AAG CCA GGG CAG GCA GAG C- 3'  
Seq-BAC-1: 5' -GGC AGA AAT TCG ATG ATA AGC- 3'  
rSV40: 5' -GGT TAA TAA GGA ATA TTT G- 3'  
Scho2-hGH: 5' -TTG GCA CTG TCC TCT CAT G- 3'  
Scho3-hGH 2: 5' -CAG ACA CAG CAT AGG CTA CC- 3'  
Scho2-BAC: 5' -CTT GAG TTG CGC CTC CT- 3'  
Scho3-BAC 3: 5' -TGA GAT CAC AGT ACC TTT CTC C- 3'

Klonierung von pBeloBAC-HD

Zur Deletion der loxP Erkennungsstelle in pBeloBAC12-SB:

PCR BAC dloxP 5': 5' -ATC TGC ATC AAG AAC TAG TTT AAG- 3'  
PCR BAC dloxP 3': 5' -GTC GTC CCT AGG CGG ACT TCC ATT GTT CAT TCC- 3'

Zur Klonierung des ColE1 Replikationsursprungs:

PCR ColE1 5': 5' -GAC GAC GAA TTC AGA GGC ATC AAA TAA AAC G- 3'  
PCR ColE1 3': 5' -GAC GAC GAA TTC AGC TCG CTT GGA CTC CTG- 3'



## 2.7.2 Plasmide

Name	Herkunft	Resistenz
pHMR272	G. Schütz, DKFZ, Heidelberg	Hyg <sup>R</sup>
pUC18	Stratagene, Heidelberg	Amp <sup>R</sup>
pUHC13-3	Ref.: Gossen & Bujard, 1992	Amp <sup>R</sup>
pUHD15-1	Ref.: Gossen&Bujard, 1992	Amp <sup>R</sup>
pUHD16-1	Angelika Bonin, Universität Heidelberg	Amp <sup>R</sup>
pUHD17-1	Ref.: Gossen <i>et al.</i> , 1995	Amp <sup>R</sup>
pUHG16-3	Ref.: Resnitzky <i>et al.</i> , 1994	Amp <sup>R</sup>
pUHG 15-30	Ref.: Kistner <i>et al.</i> , 1996	Amp <sup>R</sup>
pSV2neo	Ref.: Southern & Berg, 1982	Amp <sup>R</sup>
pX343	H. Diggelmann, Epalinges, Schweiz	Amp <sup>R</sup>
pBelo BAC12 SB2	Tina Baldinger, Universität Heidelberg	Amp <sup>R</sup>
pUHRt 62-1	Ref. : Urlinger <i>et al.</i> , 2000	Amp <sup>R</sup>
pBlueLAP	Ueli Schibler, Univ. Genf	Amp <sup>R</sup>

## 2.7.3 DNA-Marker

PFGE Low Range	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
PFGE Mid Range I & II	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
1 Kb DNA-Leiter	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

## 2.8 E. coli Stämme

DH5 $\alpha$ (WM1964)	Prof. W. Messer, MPI für Molekulare Genetik, Berlin $\Delta(lac)U169$ , <i>endA1</i> , <i>gyrA46</i> , <i>hsdR17(rK-mK+)</i> , <i>phi80</i> , $\Delta(lacZ)M15$ , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> .
DH10B	Invitrogen GmbH, Karlsruhe <i>F' mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) <i>phi80</i> , $\Delta(lacZ)M15$ $\Delta lacZX74$ <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>ara</i> $\Delta 139$ $\Delta(ara,leu)7697$ <i>galU</i> <i>galK</i> $\lambda$ <i>rpsL</i> <i>nupG</i> $\lambda$

## 2.9 Zelllinien

HeLa	Humane Cervix-Karzinom Zellen (ATCC CCL2)
HtTA	dto. mit stabil integriertem tTA-Konstrukt aus dem Plasmid pUHD 15-1 (Ref.: Gossen <i>et al.</i> , 1992)

## 2.10 Mauslinien

C57Bl/6	Charles River
R26R	Ref.: Soriano, P., 1999
TA <sup>LAP</sup> -2 (TgN (tTALap)5Uh)	Ref.: Kistner <i>et al.</i> , 1996

NZL-2 (TgN(tetNZL)2Uh)	Kistner, A. Dissertation Universität Heidelberg, 1996
LC-1 (TCL-1)	Frieder Schwenk, Dissertation Universität Köln, 1997
TA <sup>CMV</sup> -5 (TgN(tTAhCMV)3Uh)	Ref.: Kistner et al. 1996
TA <sup>CAMK</sup> -1 / TgN(CamK2a-tTA)1Mmay)	Ref.: Mayford, M., 1996, Linie B

## 2.11 Puffer, Lösungen, Medien

Acrylamid-Stammlösungen:	
für Native Gele:	30 % AA; 0,8 % Bis-AA; filtriert und entgast
für Denaturierende Gele:	40 % AA; 2 % Bis-AA, 8,3 M Harnstoff, filtriert und entgast
Antibiotikastammlösungen:	
Ampizillin (Na-Salz):	100 mg/ml in H <sub>2</sub> O
Anhydrotetrazyklin:	1 mg/ml in H <sub>2</sub> O
Doxzyklin-Hydrochlorid:	1 mg/ml in H <sub>2</sub> O
Kanamycin:	10 mg/ml in H <sub>2</sub> O
Tetrazyklin-Hydrochlorid:	1 mg/ml in H <sub>2</sub> O
Avertin-Stocklsg.:	10g 2,2,2-Tribromethanol in 10ml 2-Methyl-2-Butanol
Averin-Lösung für i.p.-Injektionen:	120µl der Avertin Stocklsg. in 10 ml 0,6% NaCl
<i>In situ</i> β-Gal-Färbelösung:	1 mg/ml X-Gal 2 mM MgCl <sub>2</sub> 5 mM K <sub>4</sub> (Fe(CN) <sub>6</sub> ) 5 mM K <sub>3</sub> (Fe(CN) <sub>6</sub> )
CaCl <sub>2</sub> -Lösung:	2,5 M in H <sub>2</sub> O, autoklaviert.
Ca-Mg-freies EDTA:	140 mM NaCl 2,7 mM KCl 16 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,8 mM EDTA
Elutionspuffer für „Salzfalle“:	3 M Na-Acetat, pH 7,0 0,02 % Bromphenolblau
Ethidiumbromid:	10 mg/ml in H <sub>2</sub> O
2x HBS-Puffer:	50 mM HEPES; pH 7.05 280 mM NaCl 10 mM KCl 1,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 12 mM (D+)Glukose
Injektionspuffer für Mäuse i.p. Injektionen:	0,9 % NaCl in H <sub>2</sub> O, steril filtriert (isotonische Kochsalzlsg.)
DNA-Injektionen:	5 mM Tris/HCl, pH 7.4, 0,1 mM EDTA
IPTG-Stammlösung:	400 mM in H <sub>2</sub> O
Inkubationspuffer für T4 DNA-Ligase (10x)	200 mM Tris/HCl, pH 7,6 50 mM MgCl <sub>2</sub> 50 mM DTT 500 mg/ml BSA (Frakt V), 1 mM ATP

LB-Medium:	1 % Bacto-Trypton 0,5 % Hefeextrakt 1,0 % NaCl	LB-Platten:	LB-Medium 1.2% Bacto-Agar
Loening-Puffer:	36 mM Tris-HCl 30 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1 mM EDTA; pH 7,8		
Luziferin-Stocklösung:	25 mM D-Luziferin (freie Säure) in 25 mM NaOH (AppliChem)		
Luziferin-Arbeitslösung:	125 µM in H <sub>2</sub> O		
Luziferin-Arbeitslösung/Promega:	470 µM Luziferin 530µM ATP 270µM Coenzym A		
Luziferase-Meßpuffer:	15 mM MgSO <sub>4</sub> 25 mM Glycylglycin pH 7,5 5 mM ATP (kurz vor Gebrauch zugeben)		
Lysepuffer für Säugerzellen :	25 mM Tris-Phosphat, pH 7,8 20 mM DTT 2 mM CDTA (altern.: EDTA) 5 % Glycerin 1 % Triton X-100		
Mäuseschwanz-Verdau-Puffer:	50 mM Tris, pH 8.0 100 mM EDTA 100 mM NaCl 1% SDS		
„Mini-Prep“-Lösungen:			
Lösung I:	50 mM Glucose 10 mM EDTA 25 mM Tris/HCl, pH 8,0	Lösung II:	0.2 M NaOH 1% SDS
		Lösung III:	3 M K-Acetat, pH 4,8 (eingestellt mit Eisessig)
ONPG-Stammlösung:	4 mg/ml in 0,1 M Na-Phosphat-Puffer, pH 7,5		
PBS-Puffer:	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 7,0		
Phenol:	Mit Tris/HCl, pH 8.0 auf pH>7 äquilibriert stabilisiert mit 0,1 % 8-Hydroxychinolin		
PMSF:	100 mM in Isopropanol		
10x Inkubationspuffer für T4 DNA-Polymerase:	330 mM Tris/HCl, pH 7,5 660 mM KAc 100 mM Mg-Acetat 5 mM DTT, 1 mg/ml BSA (Frakt. V)		

10x Inkubationspuffer für  
T4 Polynukleotidkinase: 500 mM Tris/HCl, pH 7,6  
100 mM MgCl<sub>2</sub>  
50 mM DTT  
1 mM Spermidin/HCl  
1 mM EDTA

Probenauftragspuffer zur Auftrennung von  
dsDNA in Agarose- und PAA-Gelen: 6 % Saccharose  
0,02 % Bromphenolblau  
0,02 % Orange G  
0,02 % Xylencyanol FF

QIAGEN-Puffer zur „Plasmid-Maxiprep“:

Puffer P1:	50 mM Tris/HCl, pH 8,0 10 mM EDTA, pH 8,0 100 mg/ml RNase A (frisch zugeben)	Puffer QC:	1 M NaCl 50 mM MOPS 15 % EtOH pH 7,0
Puffer P2:	200 mM NaOH 1 % SDS	Puffer QF:	1,25 M NaCl 50 mM MOPS 15 % EtOH pH 8,2
Puffer P3:	2,55 M K-Acetat, pH 4,8		
Puffer QBT:	750 mM NaCl 50 mM MOPS 15 % EtOH 0,15 % Triton X-100 pH 7,0		

10x Inkubationspuffer für Restriktionsendonukleasen (nach Boehringer Mannheim):

Puffer A:	330 mM Tris-Acetat, pH 7,9 100 mM Mg-Acetat 660 mM K-Acetat 5 mM Dithiothreitol	Puffer L:	100 mM Tris/HCl, pH 7,5 100 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM Dithiothreitol
Puffer B:	100 mM Tris-HCl, pH 8,0 50 mM MgCl <sub>2</sub> 1000 mM NaCl 10 mM β-Mercaptoethanol	Puffer M:	100 mM Tris/HCl, pH 7,5 100 mM MgCl <sub>2</sub> 500 mM NaCl 10 mM Dithiothreitol
Puffer H:	500 mM Tris/HCl, pH 7,5 100 mM MgCl <sub>2</sub> 1000 mM NaCl 10 mM Dithiothreitol		

SOB-Medium: 2% Bacto-Tryptone  
0,5% Hefe-Extrakt  
10 mM NaCl  
2,5 mM KCl

SOC Medium:	SOB-Medium plus 10 mM MgSO <sub>4</sub> 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 20 mM Glucose
Tbjab Transformationspuffer:	10 mM PIPES, pH 6,7 15 mM CaCl <sub>2</sub> 250 mM KCl 55 mM MgCl <sub>2</sub>
Tris-EDTA- Puffer / TE (1x):	10 mM Tris/HCl pH 8,0 1 mM EDTA
Tris-Acetat- Puffer , TA (1x):	40 mM Tris/HCl, pH 8,3 20 mM Na-Acetat 2 mM EDTA
Tris-Borat- EDTA-Puffer/ TBE (1x):	90 mM Tris/HCl, pH 7,8 90 mM Borsäure 3 mM EDTA
X-gal-Stammlösung:	100 mg/ml in Dimethylformamid (bei -20°C und dunkel lagern)
Z-Puffer:	100mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> / NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,5 10 mM KCl 1 mM MgSO <sub>4</sub> 50 mM β-Mercapto-Ethanol (kurz vor Gebrauch zugeben)

### 3. Methoden

#### 3.1 DNA-Transfer in *E. coli*-Zellen

##### 3.1.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen für die $\text{CaCl}_2$ -Methode

Von einer Einzelkolonie des entsprechenden Bakterienstammes wird zunächst eine Übernacht-Kultur (ÜNK) in 5 ml LB-Medium aufgewachsen. Mit 2 ml dieser ÜNK werden 500 ml LB-Medium angeimpft, bei 18°C in einem Schüttler inkubiert und bis  $\text{OD}_{600}=0,6$  aufgewachsen (ca. 40 h). Nach Erreichen der erforderlichen Zelldichte wird die Bakterienkultur 10 min auf Eis abgekühlt und anschließend werden die Zellen in der Kühlzentrifuge sedimentiert (5 min, 5000 Upm, 4°C). Der Überstand wird verworfen, die sedimentierten Zellen werden vorsichtig in 100 ml eiskalter TBjab Lösung/2% (v/v) DMSO resuspendiert und danach erneut abzentrifugiert. Schließlich werden die Zellen in 80 ml eiskalter TBjab-Lösung (ohne DMSO) vorsichtig resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellen werden erneut in der Kühlzentrifuge pelletiert und das Sediment in 18,6 ml eiskalter TBjab-Lösung aufgenommen. Danach werden zur Zellsuspension 1,4 ml kaltes DMSO gegeben (Endkonzentration 7%), die Bakterien für 10 min auf Eis stehen gelassen, schließlich in Aliquots zu 200 µl portioniert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. (Optimiertes Protokoll nach Inoue *et al.*, 1990)

Bem.: Es empfiehlt sich, alle Arbeiten im Kühlraum durchzuführen sowie vorgekühlte Materialien und Lösungen zu verwenden. Die auf diese Weise präparierten Zellen verfügen erfahrungsgemäß über eine Transformationseffizienz von bis zu  $\sim 1 \times 10^8$  Transformanten pro 0,2 ml Zellsuspension und 1 µg superhelikaler Plasmid-DNA.

##### 3.1.2 Herstellung kompetenter *E. coli* -Zellen für die Elektroporation

Von einer Einzelkolonie ausgehend werden *E. coli*-Zellen in 5 ml LB-Medium ÜN angeimpft. Diese gibt man in 1 Liter LB-Medium und lässt sie bei 37°C bis zu einer OD von 0,5-0,8 aufwachsen. Anschließend kühlt man die Zellen für 15-30 min auf Eis. Danach werden die Zellen abzentrifugiert (5 min bei 6000 Upm und 4°C) und in 500 ml eiskaltem und sterilem MilliQ-Wasser aufgenommen. Dieser Vorgang wird wiederholt. Die Zellen werden erneut abzentrifugiert (s.o.) und in 50 ml  $\text{H}_2\text{O}$  mit 10 % Glycerin (steril) resuspendiert. Nach nochmaliger Zentrifugation nimmt man die Zellen in 3 ml einer eiskalten 10%igen Glycerin-Lösung (in MilliQ-Wasser, sterilfiltriert) auf. Nachdem 40 µl der Zellen in der Elektroporationsapparatur überprüft wurden (die Zeitkonstante sollte 4,8 ms betragen, s.u.), aliquotiert man sie in gewünschter Weise und friert sie sofort in flüssigem Stickstoff ein. Die so gewonnenen Zellen können bei -70°C für ca. 1 Jahr gelagert werden.

Bem.: Die auf diese Weise präparierten Elektroporationszellen erreichen erfahrungsgemäß Transformations-effizienzen (je nach *E. coli*-Stamm) von  $10^8$  bis  $10^9$  Transformanten pro 40 µl Zellsuspension und 1 µg superhelikaler Plasmid-DNA.

##### 3.1.3 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen nach der $\text{CaCl}_2$ -Methode

Die kompetenten Zellen werden langsam auf Eis aufgetaut. Etwa 0,1 pmol Plasmid-DNA werden mit 200 µl (ca.  $2 \times 10^8$  Zellen) der kompetenten Zellen vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgt ein Hitzeschock im Wasserbad bei 42°C für 2 min. Die Zellen werden kurz auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium folgt die phänotypische Expression des Resistenzmarkers bei 37°C. Nach einer Stunde Inkubation wird ein Aliquot des Ansatzes (100 µl) auf selektivem LB-Agar ausplattiert. Um die Ausbeute an Transformanten pro Platte zu erhöhen kann der Transformationsansatz nach der phänotypischen Expression zur Konzentrierung der Zellen kurz in der Tischzentrifuge bei 8000 UpM sedimentiert werden, danach wird der Überstand verworfen, die Zellen in 100 µl LB-Medium resuspendiert und ausplattiert.

### 3.1.4 Schnellmethode zur Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Dieses einfache und schnelle Transformationsprotokoll reduziert das Standardverfahren der Transformation (s.o.) auf nur wenige Minuten. Die DNA wird dabei mit 200 µl Suspension kompetenter Zellen gemischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Danach wird der Transformationsansatz auf selektivem LB-Agar, der auf 37°C vorgewärmt wurde, ausplattiert.

### 3.1.5 Elektrotransformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Die Zellen werden auf Eis aufgetaut. Je 40 µl der Zellen werden mit der DNA (1-2µl) gemischt und in vorgekühlte Elektroporationsküvetten (1-2 mm Elektrodenabstand) pipettiert. Die Elektroporation erfolgt bei 200Ω, 25µF und 2,5kV. Die sich hieraus ergebende RxC Zeitkonstante (t) für Proben mit extrem hohen Widerstandswerten (wie in diesem Fall die Zellsuspension) beträgt theoretisch 5 ms. Bei dem verwendeten Gerät waren die Transformationseffizienzen bei Zeitkonstanten  $\geq 4,8$  ms zufriedenstellend. Kürzere Pulszeiten, die dann auftreten, wenn die Ionenstärke der Lösung zu hoch ist, führen dazu, dass die Zellen sterben. Auf die Zellen wird sofort 1 ml LB-Medium gegeben, danach werden sie mit einer Pasteurpipette in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und mit 1 ml LB-Medium (37°C) gemischt. Nach einer Stunde phänotypischer Expression bei 37°C werden die Zellen auf selektivem LB-Agar ausplattiert (Protokoll nach Dower *et al.*, 1988).

## 3.2 Isolierung und Aufreinigung von DNA

### 3.2.1 Schnellmethode zur Aufreinigung superhelikaler Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen (Plasmid-Minipräparation)

Die hier beschriebene Präparationsmethode ist abgeleitet von der Originalvorschrift nach Birnboim & Doly (1979). Das Prinzip wird im Folgenden erläutert:

Die Zellen werden durch Detergenzeinwirkung aufgebrochen, danach erfolgt eine alkalische Denaturierung der Nukleinsäuren. Anschließend wird der pH Wert erniedrigt, um die Nukleinsäuren zu renaturieren. Dabei findet eine intermolekulare Renaturierung der chromosomalen *E. coli*-DNA statt, wobei sich hochmolekulare, netzartige Strukturen bilden, während Plasmid-DNA aufgrund der topologischen Verknüpfung ihrer Einzelstränge intramolekular renaturiert. Proteine werden durch SDS denaturiert. Zelltrümmer, Membranteile, denaturierte Proteine und chromosomale DNA können anschließend durch Zentrifugation von der Plasmid-DNA und RNA abgetrennt werden.

Die Präparation erfolgt bei Raumtemperatur. Alle Lösungen werden, soweit nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur verwendet. Die Methode sei in Kurzform für 1,5 ml ÜNK dargestellt:

- Die Zellen werden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen für 5 min in der Tischzentrifuge bei 9000 UpM sedimentiert.
- Nach Verwerfen des Überstandes wird das Bakteriensediment in 100 µl Lösung I resuspendiert und für 5 min inkubiert.
- Zugabe von 200 µl Lösung II, Mischen, Inkubation für 3-4 min auf Eis.
- Zugabe von 150 µl Lösung III, Mischen durch Invertieren des Gefäßes gefolgt von einer 5-minütigen Inkubation.
- Abzentrifugieren der Probe in der Tischzentrifuge für 15 min bei 13000UpM.
- Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Nukleinsäuren werden durch Zugabe von 1 ml reinem Ethanol für 30 min bei -20°C ausgefällt.
- Zentrifugation des Präzipitates in der Tischzentrifuge bei 13000 Upm für 10 min bei 4°C.
- Waschen des Nukleinsäurepräzipitates in 0,5 ml 80%igem Ethanol und erneutes Abzentrifugieren (Tisch-zentrifuge, 5 min, 13000 Upm).
- Absaugen des Überstandes und Trocknen der DNA im 'Speed-Vac'-Konzentrator.
- Lösen des getrockneten Nukleinsäuresediments in 50 µl TE Puffer.

Die Ausbeute an Plasmid-DNA beträgt bei einer 1,5 ml Ausgangskultur bis zu 5 µg, je nach Kopienzahl des Plasmids. Die Qualität der so gewonnenen DNA ist ausreichend für Restriktions- und oft auch Sequenzanalysen. Zur Restriktionsanalyse ist es oft notwendig, dem Ansatz RNase (0,1 µg/ml) zuzusetzen.

### 3.2.2 Aufreinigung superhelikaler Plasmid-DNA über Anionenaustauscher-Chromatographie

Die präparative Aufreinigung superhelikaler Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen erfolgt nach einem modifizierten Protokoll der von Birnboim & Doly (1979) beschriebenen Methode in Kombination mit einer Säulen-chromatographie. Aufgrund ihrer Ladung lässt sich DNA über eine Anionen-Austauscher-Matrix aufreinigen. Zu diesem Zweck werden vorgepackte, kommerziell erhältliche Säulen (modifiziertes Silicagel) verwendet. Auf diese wird das Bakterienlysate in Gegenwart von 1M NaCl aufgetragen und anschließend gewaschen. Unter den gewählten Bedingungen bindet nur Plasmid-DNA an die Matrix, restliche zelluläre Komponenten lassen sich dadurch entfernen. Die Plasmide werden durch die Erhöhung der Salzkonzentration eluiert und anschließend präzipitiert. Da BAC-Moleküle wesentlich größer sind als Plasmide und nur in ein bis zwei Kopien in den *E.coli*-Zellen vorkommen, sind zu ihrer Aufreinigung einige Modifikationen des normalen Protokolls notwendig, diese sind in Klammern angegeben. Die Aufreinigung wird wie folgt durchgeführt:

- Abzentrifugieren von bis zu 500 ml ÜNK, 5 min, 5000 UpM, Rotor GS-3.
- Resuspendieren des Bakteriensediments in 10 ml (30ml) Puffer E1.
- Zugabe von 10 ml (30ml) Puffer E2, vorsichtig mischen.
- Zugabe von 10 ml (30ml) Puffer E3, Mischen durch Invertieren des Gefäßes.
- Abzentrifugieren für 20 (40) min bei 4°C bei 15000 g.

(Der Zentrifugationsschritt sollte wiederholt werden, wenn der Überstand nicht klar ist. Bei BAC-Aufreinigungen sollte der Überstand nach der Zentrifugation zusätzlich noch durch das Filtern durch einen Papierfilter von Trübungen gereinigt werden).

- Eine entsprechende Säule (z.B. Genomed Maxi) wird mit 10 ml Puffer E4 äquilibriert.
- Der Überstand des letzten Schritts wird auf die äquilibrierte Säule geladen.
- Nach Durchlauf des Bakterienlysates wird die Säule mit 30 ml Puffer E5 gewaschen.
- Die DNA wird anschließend durch 15 ml (erwärmten) Puffer E6 eluiert.
- Die DNA wird durch Zugabe von 0,7-fachem Volumen Isopropanol ausgefällt.
- Das Präzipitat wird durch Zentrifugation (12000 Upm, 20 min bei 4°C im Sorvall HB-4 Rotor) gesammelt und anschließend mit 80% Ethanol gewaschen.
- Trocknen der DNA im 'Speed-Vac'-Konzentrator (BAC-Aufreinigung: das Trocknen sollte hier nur für ca. 30 min bei RT erfolgen. Wird ein 'Speed-Vac'-Konzentrator verwendet, besteht die Gefahr, dass sich die DNA nicht vollständig zurücklöst).
- Resuspendieren der DNA in einem geeigneten Volumen TE-Puffer.

Die so gewonnene DNA ist von einer Qualität, die ihren Einsatz bei der Transfektion eukaryotischer Zellen ermöglicht.

### 3.2.3 Aufreinigung chromosomaler DNA aus Schwanzgewebe der Maus

Von ca. 3 Wochen alten Mäusen wird ein ca. 0,5 cm Stück der Schwanzspitze mit einem Skalpell abgeschnitten. Das Schwanzstück wird durch SDS und ProteinaseK-Einwirkung aufgelöst und die DNA anschließend über eine Säulenmatrix aufgereinigt. Der Einsatz eines 96er-Systems zur DNA-Präparation erspart Zeit und erleichtert die Handhabung. Die Voraussetzung ist neben dem DNeasy 96-System eine Zentrifuge, mit der die 96er Platten mit ausreichender Geschwindigkeit zentrifugiert werden können (z.B. SIGMA Laborzentrifuge 4-15). Die so gewonnene DNA ist von einer Qualität, die ihren Einsatz in Southern- oder PCR Reaktionen ermöglicht. Die Aufreinigung wurde wie folgt durchgeführt:



- Biopsie von ca. 0,5 cm Schwanzspitze und Überführung in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß. Die Lagerung bis zur DNA-Aufreinigung erfolgt bei  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- Zugabe von 180  $\mu\text{l}$  Puffer ATL und 20  $\mu\text{l}$  ProteinaseK-Lösung (20mg/ml).
- Inkubation über Nacht bei  $55^{\circ}\text{C}$ , anschließend kurze Zentrifugation in der Tischzentrifuge, um Kontaminationen zu vermeiden.
- Zugabe von 410  $\mu\text{l}$  Puffer AL/E, intensives Mischen, erneut kurze Zentrifugation.
- Überführen des Überstandes in die 96er Platten.
- Waschen des DNA-Sedimentes mit 500  $\mu\text{l}$  Puffer AW1.
- Waschen des DNA-Sedimentes mit 500  $\mu\text{l}$  Puffer AW2.
- Trocknen der Säulenmatrix bei  $70^{\circ}\text{C}$ .
- Elution mit 250  $\mu\text{l}$  vorgewärmten Puffer AE, Lagerung bei  $4^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.4 Aufreinigung chromosomaler DNA aus Leberzellen

Zur Herstellung einer BAC-Bank werden möglichst große genomische DNA-Fragmente in hoher Reinheit benötigt. Die Manipulation von nackter DNA dieser Größe in Flüssigkeit verursacht aber leicht Doppelstrangbrüche aufgrund von Scherkräften. Um diese mechanische Fragmentierung zu vermeiden, kann die DNA in eine Agarose-Matrix eingebunden werden. Intakte Zellen werden in der Agarose immobilisiert, durch ProteinaseK-Verdau werden die Zellwände aufgebrochen und alle Proteine in kleine Fragmente zerlegt, die anschließend aus der Agarosematrix ausgewaschen werden können. Das DNA-haltige Agarose-Blöcken kann so behandelt werden, als wäre die DNA in Lösung, d.h. man kann sie mit Restriktionsenzymen verdauen oder sie in Ligationsreaktionen einsetzen. Leberzellen eignen sich aufgrund ihres hohen DNA-Gehaltes besonders gut für eine Aufreinigung von chromosomaler DNA. Um eine schonende Aufreinigung zu gewährleisten, wurde hier auf ein Protokoll von Bruce Birren und Eric Lai (Birren & Lai, 1993) zurückgegriffen. Hierbei wird das Lebergewebe zunächst in Einzelzellen zerlegt, die dann in Agarose-Blöckchen eingegossen werden. Alle folgenden Schritte werden in diesen Blöckchen durchgeführt, um die DNA nicht Scherkräften auszusetzen. Aus diesem Grund muss die Agarose, die dazu verwendet wird, von größter Reinheit sein (z.B. FMC *InCert* Agarose). Das Protokoll im Detail:

- Das Lebergewebe wird mit einem Skalpell in kleine Stücke geschnitten und weiter mit Hilfe eines Mikro-Gewebe-Handhomogenisators (z.B. Wheaton, Dounce 1ml „tight fitting“) in Einzelzellen zerlegt.
- Waschen der Zellen mit PBS, dabei Entfernen von größeren Zellhaufen.
- Bestimmung der Konzentration in der Zählkammer, danach Zentrifugation (5 min bei 1500 rpm) und Resuspension in PBS ( $2-4 \times 10^7$  Zellen/ml).
- Erwärmen der Zellsuspension auf  $37^{\circ}\text{C}$ .
- Mischen mit dem gleichen Vol. 1% „low melting“ *InCert* Agarose (in PBS,  $40^{\circ}\text{C}$ ).
- Verteilen der Agarose/Zellsuspension auf die Block-Formen, erhärten lassen (ca. 10 min bei  $4^{\circ}\text{C}$ ).
- Verdau der Blöckchen mit Proteinase K-Puffer im 3-5 fachen Volumen für mind. 24 - 48 h bei  $50^{\circ}\text{C}$ .
- 3-4-maliges Waschen der Blöckchen mit Tris/EDTA-Waschpuffer durch 1-stündige Inkubation bei Raumtemperatur.
- Aufbewahrung der Blöckchen bei  $4^{\circ}\text{C}$  im Waschpuffer.

Die Endkonzentration der Zellen in den Blöckchen ist ca.  $1 \times 10^7$  Zellen /ml. Dies entspricht etwa 5-10  $\mu\text{g}$  DNA bei einem Block-Volumen von 50-80  $\mu\text{l}$ . Die Zellkonzentration sollte nicht höher gewählt werden, da Puls-Feld-Gele sehr anfällig für Überladung mit DNA sind. Werden die so gewonnenen DNA-Agarose-Blöckchen zur Restriktionsanalyse eingesetzt, sollte einer der Waschschrte mit 1 mM PMSF Lösung durchgeführt werden.

### 3.2.5 Extraktion von Proteinen aus Nukleinsäurelösungen (Phenolextraktion)

Zur Entfernung von Proteinen aus Nukleinsäurelösungen versetzt man diese mit dem gleichen Volumen an äquilibriertem Phenol ( $\text{pH} > 7$ ). Über einen Zeitraum von 2-3 min werden beide Phasen durch kräftiges Schütteln gemischt und danach zur Phasentrennung zentrifugiert (Tischzentrifuge, 5 min, 13000 Upm). Die denaturierten Proteine sind häufig als weißer Film in der Interphase zu erkennen. Die wässrige Oberphase wird bei Bedarf weiteren Phenolextraktionen unterzogen. Zur weiteren Verwendung wird die DNA-Lösung von Phenolresten befreit. Dies erfolgt durch eine zweite Extraktion der wässrigen Phase mit äquivalentem Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (24:1). Anschließend wird die DNA mit Ethanol präzipitiert und in einem angemessenen Volumen TE-Puffer aufgenommen.

Alternativ, z.B. bei geringer Proteinkonzentration in der DNA-Lösung oder bei niedrigeren Qualitätsansprüchen an die DNA, können Proteine auch durch eine einmalige Behandlung mit einem Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1) extrahiert werden.

### 3.2.6 Photometrische Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäurelösungen

Gemäß dem Lambert-Beer'schen Gesetz ist die Konzentration einer Lösung direkt proportional zu ihrer Extinktion bzw. Absorption. Diese Relation macht man sich bei der spektralphotometrischen Quantifizierung von wässrigen Nukleinsäure-Lösungen zu Nutze.

Von einer Verdünnung der gereinigten Nukleinsäure wird im Spektralphotometer die Absorption bei 260 nm (Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren) und bei 280 nm (Absorptionsmaximum aromatischer Aminosäuren von Proteinen) bestimmt. Die Messung erfolgt in 500 µl Quarzküvetten (Schichtdicke 5mm). Es existiert folgende Beziehung zwischen gemessener Absorption und Konzentration der Nukleinsäurelösung:

1  $\text{OD}_{260\text{nm}}$  = 50 mg/ml für dsDNA

1  $\text{OD}_{260\text{nm}}$  = 40 mg/ml für ssRNA

1  $\text{OD}_{260\text{nm}}$  = 30 mg/ml für ssOligonukleotide

Ein Maß für die Verunreinigung mit Protein liefert der Quotient aus gemessener  $\text{OD}_{260\text{nm}}$  und  $\text{OD}_{280\text{nm}}$ . Dieser Wert sollte für qualitativ anspruchsvolle, d.h. proteinfreie Nukleinsäurelösungen, 1,8 bis 2,0 betragen.

## 3.3 Analyse von DNA

### 3.3.1 Fragmentierung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die spezifische dsDNA-Sequenzen erkennen und beide Stränge schneiden. Diese Enzyme erkennen Tetra-, Penta-, Hexa- oder Oktanukleotidsequenzen mit Rotationssymmetrie. Die Hydrolyse beider Stränge erfolgt dabei in der Erkennungssequenz, wobei einzelsträngige 5'- bzw. 3'-Überhänge oder doppelsträngige, glatte Enden (blunt-ends) entstehen. Die 5'-Termini sind stets phosphoryliert, die 3'-Termini stets hydroxyliert. Auf diese Weise ist es möglich, DNA-Moleküle sequenzspezifisch zu fragmentieren. Grundsätzlich benötigt jedes Restriktionsenzym individuelle Reaktionsbedingungen zur Hydrolyse, diese sind vom Hersteller angegeben. Besitzen verschiedene Restriktionsenzyme gleiche Anforderungen bezüglich der Reaktionsbedingungen, so kann eine zu spaltende DNA gleichzeitig mit einer Mischung dieser Enzyme verdaut werden. Ist dies nicht der Fall, erfolgt die Restriktion sequentiell, wobei nach dem betreffenden Schritt die DNA mit Ethanol präzipitiert und dann im entsprechenden Reaktionsmilieu rekonstituiert werden muss. Analytisch werden etwa 0.5-1 µg Plasmid DNA fragmentiert.

Die Menge an einzusetzenden Enzymen pro Ansatz wird aus den Aktivitätsangaben (units/µl) des Herstellers errechnet. Eine unit ist definiert als die Menge an Enzym, die notwendig ist, um 1 µg l-DNA vollständig in einer Stunde zu spalten.

Das Ansatzvolumen ist abhängig von der Menge der zu verwendenden Restriktionsenzyme. Käufliche Enzympräparationen enthalten oft bis zu 50% Glycerin. Die Glycerinkonzentration im Reaktionsansatz sollte 5 % nie

übersteigen, da Restriktionsenzyme allgemein bei zunehmenden Glycerinkonzentrationen „Star-Aktivität“ zeigen (Polisky *et al.*, 1975).

Die Inkubationszeit für eine Restriktionsanalyse von Plasmid-DNA beträgt im Allgemeinen 1-2 h. Längere Inkubationszeiten sind jedoch, möglich, insbesondere um geringe Enzymmengen zu komplementieren. Bei Fragmentierung von 'Mini-Prep'-DNA kann wegen des hohen Anteils an RNA dem Ansatz zusätzlich RNase A (50 µg/ml Endkonzentration) zugegeben werden, um diese zu degradieren.

Hitzelabile Restriktionsenzyme werden bei Bedarf durch Erhitzen auf 65°C für 5 min inaktiviert, während hitzestabile Restriktionsenzyme durch Phenol/Chloroform extrahiert werden können.

### **3.3.1.1 Fragmentierung von genomischer DNA in Agarose-Blöckchen**

Die Technik der Präparation von genomischer DNA in Agarose-Blöckchen ist ein entscheidender Fortschritt bei der Gewinnung von großen DNA-Molekülen. Ein Nachteil dieser Methode ist allerdings, dass folgende enzymatische Reaktionen durch die Einbettung in Agarosematrix behindert werden. Die Anwesenheit der Agarose kann z.B. einige enzymatische Reaktionen inhibieren, auf jeden Fall wird aber die Zugänglichkeit aller Enzyme zur DNA erschwert. Aus diesem Grund müssen einige Modifikationen des Protokolls im Vergleich zu einem normalen Restriktionsverdau beachtet werden. Generell werden die Enzyme zumindest teilweise durch die Anwesenheit der Agarose inhibiert. Aus diesem Grund müssen höhere Konzentrationen eingesetzt (ca. 30-50 U pro 100µl Blöckchen) und die Dauer des Verdau verlängert werden (am besten über Nacht, mindestens aber 2-3 Stunden). Inzwischen gibt es von einigen Herstellern (z.B. New England BioLabs) auch Tabellen, in denen die Fähigkeit der verschiedenen Restriktionsenzyme angegeben ist, in Agarose eingebettete DNA zu verdauen. Weiterhin ist zu beachten:

- pro Verdau-Ansatz sollte nur ein Agarose-Blöckchen eingesetzt werden,
- Inkubation des Agarose-Blöckchens in 0,5 -1 ml 1x Restriktionspuffer für ca. 1 Stunde bei Raumtemperatur vor dem eigentlichen Verdau,
- für den Verdau frischen Restriktionspuffer verwenden,
- Verdau-Kontrollen ohne Restriktionsenzyme („Mock-Verdau“) bei jeder Präparation von neuen Blöckchen, um Kontaminationen mit Nukleasen bei der DNA Präparation oder in den Puffern zu detektieren.

### **3.3.1.2 Partieller Verdau von genomischer DNA in Agarose-Blöckchen durch Methylase Konkurrenz**

Zur Herstellung einer BAC-Bank werden möglichst große Restriktionsfragmente der genomischen DNA benötigt. In meinen Experimenten wurde der Vektor pBeloBAC-HD (siehe Abschnitt 4.3.1.1) verwendet, in dem eine EcoRI-Restriktionsschnittstelle zur Klonierung von genomischer DNA vorhanden ist. Die Erkennungssequenz von EcoRI (GAATTC) kommt aber relativ häufig im Mausgenom vor, ein kompletter Verdau führt zu Fragmenten, die im Schnitt nur 4000 Bp groß sind. Aus diesem Grund musste eine Methode angewendet werden, die verhindert, dass jede EcoRI-Schnittstelle erkannt wird, sondern möglichst große Fragmente durch einen partiellen Verdau entstehen.

Hierzu gibt es mehrere Möglichkeiten, wie z.B. die Limitierung des Enzyms oder der Reaktionszeit, limitierende Mg-Konzentration oder Methylase-Konkurrenz. In meinen Versuchen war die Konkurrenz-Methode die zuverlässigste und zeigte die beste Reproduzierbarkeit, weshalb ich mich hier auf die Beschreibung dieser Technik beschränke. Der Nachteil dieses Verfahrens ist, dass es nicht für alle Restriktionsenzyme angewendet werden kann, denn es sind nur wenige Kombinationen von Enzymen und ihren entsprechenden Methylasen bekannt bzw. kommerziell erhältlich. Die Methylase ist der natürliche Gegenspieler des Restriktionsenzym, denn sie erkennt die gleiche Sequenz wie die Endonuklease, d.h. die beiden Enzyme konkurrieren um die Bindungsstellen in der genomischen DNA. Die Stellen, die zuerst von der Methylase erkannt werden, werden modifiziert, und so das Schneiden an diesen Stellen durch EcoRI verhindert.

In meinen Experimenten wurde ein Verhältnis von 1: 20 (Endonuklease/Methylase) eingesetzt, was zu DNA Fragmenten in der Größe von mehr als 100 kb führte. Grundsätzlich müssen aber die Reaktionsbedingungen immer auf die jeweilige DNA-Konzentration in den Blöckchen eingestellt werden. Bei einem Blöckchen von ca.

80 µl mit ca. 10 µg DNA verwendete ich normalerweise 10-15 U EcoRI und 200 U der EcoRI-Methylase (beides New England BioLabs) in einem Reaktionsvolumen von 300 µl und verdaute den Ansatz bei 37°C für 2,5-3 Stunden. Als Methylgruppen-Donor fungiert S- Adenosylmethionine (SAM), das in einer 80 µM Konzentration eingesetzt wurde.

Die Reaktion wird durch die Zugabe einer 60 mM EDTA/1,5 mg/ml ProteinaseK-Lösung und Inkubation bei 50°C für 30 min gestoppt. Falls weitere enzymatische Reaktionen in den Agarose-Blöckchen folgen, sollte die Proteinase durch einen Waschschrift mit 1 mM PMSF Lösung inaktiviert werden.

### 3.3.2 Gelelektrophoretische Analyse von Nukleinsäuren

Die Wanderungsgeschwindigkeit von Nukleinsäuren in einer Trägermatrix (Gel) ist, sofern sich dieses System in einem elektrischen Feld befindet, infolge des konstanten Ladungs-Masse-Verhältnisses der Nukleinsäuren umgekehrt proportional zum Logarithmus des Molekulargewichts und darüber hinaus abhängig von der Topologie. Die Wahl des Gelsystems (Polyacrylamid-Gele, Agarose-Gele, PFGE) ist bestimmt von der Größe der zu trennenden Moleküle.

Die durch Polymerisation entstandene, kovalent verknüpfte Matrix der Polyacrylamid-Gele erlaubt die Auftrennung kleinerer DNA-Moleküle (Oligonukleotide bis Fragmente von wenigen kbp). Bei diesem Gelsystem beeinflussen sowohl die Gelkonzentration als auch der Vernetzungsgrad seine Auflösungseigenschaften.

Das parakristalline Maschensystem der Agarosegele erlaubt die Auftrennung hochmolekularer DNA (einige 100 bis mehrere 1000 Basenpaare). Die Maschendichte wird von der Agarosekonzentration bestimmt, die zwischen 0,5 und 2,5% variiert werden kann. Um noch größere DNA-Moleküle aufzutrennen, muss man sich einer besonderen Art der Gelelektrophorese bedienen, der PFGE, in der das elektrische Feld nicht konstant von einem Pol zum anderen verläuft, sondern die Richtung der Elektrophorese in bestimmten Zeitabständen wechselt (s.u.). Die Herstellung, Verwendung und Behandlung der verschiedenen Gelsysteme ist prinzipiell von Sambrook *et al.*, 1989 bzw. Bruce Birren & Eric Lai, 1993 beschrieben.

#### 3.3.2.1 Auftrennung von dsDNA in nativen Polyacrylamid-Gelen

Zur Analyse von DNA-Fragmenten von 40 bis 2000 Bp werden 4-8 %ige PAA-Gele mit einem Vernetzungsgrad von 30:0,8 (AA:Bis-AA) in 1x TA-Puffer benutzt. Zur Einleitung der Polymerisation werden nacheinander 2 µl TEMED (als Radikalstabilisator) und 4 µl APS (als Radikalstarter; 10% in H<sub>2</sub>O) je ml der AA-Lösung zugegeben. Danach wird das Gel luftblasenfrei zwischen zwei vorbereitete Glasplatten gegossen. Die Dicke der Gele beträgt 1,0 mm für analytische und 2,5 mm für präparative Gele. Den Proben wird 1/10 Volumen Auftragspuffer 1 zugegeben. Die Elektrophorese erfolgt in einer Vertikalgelapparatur und wird bei 15V/cm durchgeführt.

Xylencyanol und Bromphenolblau komigrieren in einem 6%igen PAA-Gel mit DNA-Fragmenten von 220 bzw. 70 Bp Länge, während Orange G an der Lauffront wandert.

#### 3.3.2.2 Auftrennung hochmolekularer DNA und topologischer Isomere im Agarosegel

Agarosegele finden Verwendung zur Auftrennung hochmolekularer DNA (>1000 Bp). Im Rahmen dieser Arbeit wurden Agarosegele zur Analyse der topologischen Form und der Größe von Restriktionsfragmenten bzw. PCR-Produkten eingesetzt. Hergestellt werden Agarosegele, indem eine gewöhnlich 1%ige Agarosesuspension in 1/2x Loening-Puffer durch Kochen im Mikrowellenherd gelöst wird. Nachdem die Lösung auf ca. 50-60°C abgekühlt ist, wird sie in eine, mit einem „Kamm“ bestückte Flachgelapparatur gegossen. Nach Erstarren der Lösung überschichtet man das Gel mit 1/2x Loening-Puffer (ca. 2-3 mm) und entfernt den Kamm. In die Aussparungen, die der Kamm hinterlassen hat, werden die Proben aufgetragen, welche zuvor mit 1/10 des Volumens mit Auftragspuffer 1 (10-fach konzentriert) gemischt wurden. Dies erleichtert aufgrund des hohen Saccharosegehalts (6%) das Auftragen der Proben. Darüber hinaus erlauben die im Auftragspuffer enthaltenen Farbmarker eine Kontrolle der zurückgelegten Laufstrecke während der Elektrophorese. Für 0,8%ige Gele gilt, dass Orange G an der Lauffront wandert, während Xylencyanol etwa mit einem DNA-Molekül der Größe von 2 kbp komigriert. Die Elektrophorese wird bei 5-10 V/cm in einer Flachgelapparatur über die erforderliche Zeit durchgeführt.

Nach der Elektrophorese wird die DNA im Agarosegel für 20 min in Ethidiumbromidlösung (1µg/ml) ange-färbt und kann im UV-Licht (250-360 nm) sichtbar gemacht und photographiert werden. Die Nachweisgrenze liegt dabei bei 20 ng pro „DNA-Bande“.

### **3.3.2.3 Auftrennung hochmolekularer DNA durch PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis)**

Ab einer bestimmten Größe (ca. 15 Kb) ist die Laufstrecke von Nukleinsäuren nicht mehr umgekehrt proportional zum Logarithmus des Molekulargewichts, sondern die Wanderungsgeschwindigkeit nimmt immer mehr ab. Deshalb muss man sich eines Tricks bedienen, um auch größere Fragmente in guter Auflösung und proportional zu ihrer Größe aufzutrennen. Wird während der Elektrophorese die Richtung des elektrischen Feldes regelmäßig geändert, müssen sich die negativ geladenen DNA-Fragmente immer wieder neu ausrichten. Die Dauer dieses Vorgangs während einer Elektrophorese überführt das Verhältnis zwischen Größe und Laufgeschwindigkeit auch bei großen Fragmenten wieder ins Proportionale. Diese Methode wird Puls-Feld-Gelelektrophorese („Pulsed Field Gel Electrophoresis“, kurz PFGE) genannt. Zur PFGE wird eine spezielle Apparatur benötigt, die es ermöglicht, in bestimmten Zeitabständen 2 verschiedene elektrische Felder anzulegen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Gerät der Firma BIO-RAD verwendet, das „CHEF-DR III-Pulsed Field Electrophoresis System“. Wie bei normalen Gelelektrophorese-Techniken können hier verschiedene Puffer zur Auftrennung der DNA verwendet werden, üblicherweise jedoch 0,5 x TBE. Je nach Größe der aufzutrennenden DNA müssen die Bedingung der Elektrophorese eingestellt werden (siehe z.B. auch Abschnitt zur Präparativen Aufreinigung von BAC-Fragmenten). Dazu ist die Erklärung von molekularbiologischen Begriffen notwendig, die bei der Anwendung der PFGE gebraucht werden:

Wechsel Intervall: „switch interval“ Zeitraum, in der eines der alternierenden elektrischen Felder aktiv ist (auch „switch time“ oder „pulse time“ genannt). Je größer die aufzutrennenden Fragmente sind, desto länger sollte der Intervall zwischen den beiden Elektrischen Feldern gewählt werden. Normalerweise wird ein Intervall-Gradient eingestellt, am Anfang mit kurzen gegen Ende mit längeren Wechsel-Intervallen.

Reorientierungs-Winkel: Winkel zwischen den beiden alternierenden elektrischen Feldern, d.h. der Winkel zwischen den beiden Richtungen, in die die DNA wandert. Hier hat sich für meine Anwendungen ein Winkel von 120° als optimal herausgestellt.

Die Bedingungen der PFGE für die Auftrennung der partiell verdauten genomischen DNA (>100Kb) sind :

*Dauer: 18 h*

*Stromstärke: 6 V/cm,*

*Reorientierungs-Winkel: 120°*

*Wechsel-Intervall: 15-35 sec*

*Temperatur: 14 °C*

Zur Auftrennung von BAC-Minipreps wurden die gleichen Bedingungen gewählt, allerdings mit einem kürzeren Wechsel-Intervall (1-15 sec). Die Agarose-Konzentration im Gel beträgt üblicherweise 1%.

### **3.3.3 Anfärben von Nukleinsäuren in Gelen mit Ethidium-Bromid**

Nukleinsäuren in Agarose- und PAA-Gelen können durch Anfärbung mit Ethidium-Bromid (EtBr) sichtbar gemacht werden. EtBr interkaliert in Nukleinsäuren und kann durch Bestrahlung mit ultrakurzwelligem Licht zur Fluoreszenz angeregt werden (optimale Intensität bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 254nm).

Das zu färbende Gel wird für 10-30 min in einer EtBr-Lösung (1µg/ml) angefärbt. Unspezifisch in das Gel eingelagertes EtBr sollte durch 2x10-minütiges Waschen in H<sub>2</sub>O entfernt werden. Die Nukleinsäuren können jetzt auf einer UV-Leuchtplatte sichtbar gemacht und photographiert werden.

### 3.3.4 Identifizierung spezifischer DNA-Fragmente in chromosomalen DNA-Präparationen durch „Southern-Blot“-Analyse

Bei diesem Nachweisverfahren wird mit Restriktionsenzymen verdaute genomische DNA in einem Agarosegel aufgetrennt und anschließend unter denaturierenden Bedingungen auf eine Nylonmembran transferiert. Gegen die immobilisierten DNA-Fragmente wird eine spezifische, radioaktiv markierte DNA-Sonde hybridisiert. Nach Waschschritten zur Entfernung von unspezifischen Bindungen werden die mit der radioaktiven Sonde hybridisierenden genomischen DNA-Fragmente autoradiographisch sichtbar gemacht.

Bei der Analyse von Maus-DNA ist es wegen der hohen Konzentration von Restriktionsenzymen im Ansatz (bis zu 150U pro 10µg DNA) notwendig, den Restriktionsverdau in einem großen Volumen durchzuführen (200µl, 3-6 h). Danach wird die fragmentierte DNA nach Zugabe von 10% 3M NaAc mit Ethanol ausgefällt, gewaschen und in 40µl H<sub>2</sub>O gelöst. Die Methode wird dann wie folgt durchgeführt:

- ca. 10µg restriktionsverdaute, genomische DNA pro Spur werden auf einem 1% Agarosegel bei 1V/cm ÜN elektrophoretisch aufgetrennt und das EtBr-gefärbte Gel photographiert.
- Die DNA wird mit einem Vacuumblotter (Appligene) auf eine befeuchtete, positiv geladene Nylonmembran (Amersham Hybond N+) transferiert. Der angelegte Unterdruck beträgt dabei 50mbar, als Transfer- und Denaturierungsmedium dient 0,4M NaOH Lösung. Die Transferzeit beträgt, abhängig von Dicke und Größe des Gels, 45-90 min.
- Nach Beendigung des Transfers wird die Position der Geldaschen durch die Agarose hindurch mit einem Kugelschreiber auf der Membran markiert.
- Anschließend wird der Filter zur Entfernung von EtBr und Farbmarkern bei 65°C für 20 min in 0,2xSSC, 0,5%SDS gewaschen.
- Der Filter wird auf einem Plastiknetz eingerollt und in einer Glasröhre (Hybaid) mit 15ml Vorhybridisierungslösung (Hybridisierungslösung ohne Sonde) bei 65°C für mindestens 30min in einem Hybridisierungssofen (Hybaid) inkubiert.
- Die Vorhybridisierungslösung wird gegen die Hybridisierungslösung (d.h. incl. Sonde, ca.  $1 \times 10^6$  cpm/ml) ausgetauscht und der Filter damit 24h. inkubiert. Die Sonde wird durch radioaktive Markierung mit „random priming“ erhalten (s.u.).
- Anschließend wird der Filter für 3x 40 min in 1xSSC, 0,2%SDS gewaschen.
- Der so gewaschene Filter wird mit einer Frischhaltefolie abgedeckt. Die Autoradiographie erfolgt entweder mit einem Röntgenfilm bei -70°C mit einer Intensivierungsfolie oder bei RT mit einer Detektionsplatte des „Phosphoimagers“. Die Sensitivität der Methode erlaubt den Nachweis eines „single copy“-Gens bei einer Filmexposition ÜN oder einer Auswertung auf dem Phosphoimager nach 3-4h.

## 3.4 In vitro-Modifikation und Rekombination von DNA

### 3.4.1 Isolierung von DNA-Fragmenten aus PAA-oder Agarose-Gelen

#### 3.4.1.1 Elektroelution mit Hilfe der Salzfalle

DNA-Fragmente werden aus Gelen isoliert und z. B. für Ligierungen und andere *in vitro*-Experimente verwendet. Gegenüber Agarosegelen bietet die Verwendung von PAA-Gelen zur präparativen Isolierung von DNA-Restriktionsfragmenten den Vorteil, dass „Verunreinigungen“ von superhelikaler Plasmid-DNA nicht in die PAA-Matrix eindringen. Somit kann störende ccc-Plasmid-DNA quantitativ von den zu isolierenden DNA-Restriktionsfragmenten abgetrennt werden.

Die betreffende DNA-Bande wird nach EtBr-Färbung mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in die „Salzfalle“, einer speziell für die Elektroelution angefertigten Apparatur, gegeben. Dabei wird die DNA bei geringer Ionenstärke (1/2x TBE-Puffer, 180V) aus dem Gelstück eluiert und wandert in ein sogenanntes „Hoch-

salzkissen“ (75 µl an 3M Na-Acetat, angefärbt mit Bromphenolblau). Hier erfolgt ein Ladungsausgleich, wodurch die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA soweit reduziert ist, dass sie an der der Kathode zugewandten Seite des Salzkissens akkumuliert. Die Elution wird, abhängig von der Größe des DNA-Fragments, zweimal für 15-45 min durchgeführt. Dabei wird das Eluat (200 µl) jeweils mit einer 1ml-Spritze (wobei die Spitze der Kanüle abgeschnitten wurde) entnommen. Aus dieser Lösung wird die DNA mit 2,5 fachem Volumen Ethanol ausgefällt, mit 80%igen Ethanol gewaschen, getrocknet und in einem adäquaten Volumen an TE-Puffer aufgenommen. Elutionen radioaktiv markierter DNA-Fragmente zeigten, dass Moleküle unter 200 Bp praktisch quantitativ, Fragmente bis 1000 Bp zu > 80% eluiert werden können.

#### **3.4.1.2 Elektroelution in Dialyseschläuche**

Die wohl schonendste Methode zur Aufreinigung von hochmolekularen genomischen DNA-Fragmenten aus (Pulsed Field) Agarose Gelen ist die der Elektroelution. Dazu schneidet man die DNA-Bande aus dem entsprechenden Gel und gibt es in einen kleinen Dialyseschlauch zusammen mit einem kleinen Volumen an 0,5 x TBE Puffer. Nach ca. 3 h Dialyse gegen kalten (4°C), sterilen 0,5 x TBE-Puffer wird der Schlauch in eine Elektrophorese-Kammer gegeben und bei 2-3 V/cm Elektrodenabstand für 3 Stunden dem elektrischen Feld ausgesetzt (bei einer mittleren Gelkammer ca. 75-100 V). Kurz vor Schluss der Elektrophorese wird die Stromrichtung für etwa 30 sec umgepolt, um die DNA-Fragmente von der Wand des Dialyseschlauches zu lösen. Anschließend pipettiert man den Puffer, in dem sich nun ein Großteil der DNA-Fragmente befinden sollte, aus dem Dialyseschlauch.

#### **3.4.1.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Bei dieser Methode macht man sich die Eigenschaft der DNA zunutze, unter bestimmten Bedingungen (hohe Konzentration kaotroper Salze, wie z. B. NaJ) reversibel an eine Glasmilchmatrix zu binden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Produkt der Firma Gibco verwendet, bei dem Glasmilchmatrix in einem Aufreinigungssäulchen an eine Membran gekoppelt ist. Die Methode ist im Folgenden kurz beschrieben:

- Nach der elektrophoretischen Auftrennung wird die betreffende DNA-Bande mit einem Skalpell unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten, danach die Masse des Gelstückchens bestimmt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.
- Zum Gelstück werden pro 100 mg 300 µl Puffer 1 zugegeben.
- Die Mischung wird bei 55°C inkubiert bis das Gelstückchen geschmolzen ist und die DNA wieder in Lösung vorliegt. Alle 3 min ist die Mischung zu schütteln.
- Die Probe wird auf das Säulchen aufgetragen und bei 10 000 g für 30 sec zentrifugiert.
- Fakultatives Waschen der an die Säulenmatrix gebundenen DNA durch Auftrag von 500 µl Puffer1, Zentrifugation der Probe wie oben beschrieben.
- Waschen der Säulenmatrix durch Auftrag von 700 µl Puffer 2, erneute Zentrifugation,
- Die Elution der DNA von der Säulenmatrix erfolgt mit 50 µl warmen TE-Puffer (ca.50°C), Zentrifugation bei 10 000 g für 2 min.
- Quantitative Analyse eines Aliquots des eluierten DNA-Fragmentes (1/10 des Elutionsvolumens) durch Gelelektrophorese.

#### **3.4.1.4 Präparative Aufreinigung von BAC-Fragmenten**

Ca. 50µg der BAC-DNA werden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und auf ein 1%iges PFG aufgetragen. Neben dem präparativen Verdau sollte zusätzlich auch ein weiteres Aliquot des Verdaus und HMW-Marker aufgetragen werden, um später eine Größenbestimmung durchführen zu können. Die DNA wird zunächst durch eine erste Elektrophorese aufgetrennt und die gewünschten Fragmente in einem zweiten Lauf wieder konzentriert. Die Bedingungen der PFGE:

1. Lauf:	<i>Dauer: 17 h</i>	2. Lauf:	<i>Dauer: 15 h</i>
	<i>Stromstärke: 6 V/cm,</i>		<i>Stromstärke: 6 V/cm,</i>
	<i>Reorientierungs-Winkel: 120°</i>		<i>Winkel: 120°</i>
	<i>Wechsel-Intervall: 10-35 sec</i>		<i>Intervall: 1-10 sec</i>
	<i>Temperatur : 14 °C</i>		<i>Temperatur : 14 °C</i>

Nach dem 1. Lauf wird das Gelstück, auf dem sich der Marker und das BAC-Aliquot befinden, in Ethidium-Bromid-Lösung gefärbt (0,5 g/ml in H<sub>2</sub>O). Auf der Höhe der Zielbande wird eine Kerbe in das Gel geschnitten. Mit Hilfe dieser Markierung ist es möglich, die Position der linearen BAC-Fragmente im nicht gefärbten Teil zu lokalisieren. Mit einer Rasierklinge wird ein möglichst kleines Agarosestück mit der linearen BAC-DNA ausgeschnitten.

Für die meisten weiteren Anwendungen ist eine Konzentrierung der DNA mit anschließender Elution aus der Agarose notwendig. Dazu wird ein zweiter PFGE-Lauf gestartet. Hier werden die ausgeschnittenen Gelstücke aus dem 1. Lauf in spezieller 3%iger „low melting point“- (niedere Schmelztemperatur) Agarose eingegossen und im 90° Winkel gedreht. Durch die erneute Elektrophorese wandern die DNA-Fragmente aus ihrem „alten“ 1%igen Gelstück heraus, bleiben aber in der hochprozentigen „low melting point“- (LMP) Agarose „stecken“. Erneut wird ein möglichst kleines Stück aus dem Gel herausgeschnitten, in dem nun in hoher Konzentration die BAC-Fragmente vorliegen.

Um die DNA aus dem Gel zu isolieren, wird das Enzym Agarase (oder GELase) verwendet, das in der Lage ist, die langkettigen Polysaccharide der LMP-Agarose zu kurzkettigen Oligosacchariden abzubauen, sodass sich die DNA wieder in Lösung befindet. Dazu wiegt man das Gelstück und setzt eine entsprechende Menge konzentrierten Reaktionspuffer hinzu. Alternativ kann man das Gelstück auch 2-mal eine halbe Stunde in dem Enzympuffer inkubieren (dazwischen sollte der Puffer gewechselt werden), um so die Reaktionsbedingungen einzustellen. Durch eine ca. 10 min Inkubation bei 68° C schmilzt die Agarose, sodass die Zuckerreste im Gel der Agarase/Gelase zugänglich werden. Da die Agarase aber nur bis max. 45°C aktiv ist, muss die geschmolzene Agarose erst auf diese Temperatur abgekühlt werden, bevor das Enzym zugesetzt werden kann (ca. 1 unit für 100 mg Gel, bei TBE-Gelen etwa die 3fache Menge an Enzym, da die Borat-Ionen die Enzymaktivität hemmen). Die Reaktion selbst findet bei 45°C für 1-2 Stunden statt.

Nach dem Verdau werden die unverdauten Agarose-Reste durch eine 10-minütige Zentrifugation (RT, 14000rpm) abgetrennt.

Bei kleineren BAC-Fragmenten kann die DNA aus dem Überstand durch normale EtOH-Fällung gewonnen werden, das Rücklösen der DNA sollte hier aber sehr vorsichtig geschehen, da lineare DNA dieser Größe sehr anfällig für Scherkräfte ist (ab diesem Schritt sollten nur noch Pipettenspitzen mit weiter Öffnung verwendet werden). Die DNA wird idealerweise schon in dem Puffer rückgelöst, in dem weitere Reaktionen stattfinden sollen (z.B. Puffer zur Mikroinjektion).

Bei größeren BAC-Fragmenten ( $\geq 100\text{kb}$ ) können zur Konzentrierung der DNA-Lösung anstelle des zweiten Laufs (oder zusätzlich) sog. Microcon-Säulchen (Millipore) zur Konzentrierung der DNA verwendet werden. Diese basieren auf dem Ausschlussprinzip von kleinen Molekülen durch Zentrifugation. Wird die linearisierte BAC-DNA zur Mikroinjektion verwendet, sollte sie bei 4°C 3-4 h gegen den Injektionspuffer dialysiert werden (Millipore Nitrozellulose Filter oder PIERCE Slide-A-Lyser MINI Dialysis unit s.u.).

### **3.4.2 Auffüllen von 5'-überhängenden, bzw. Entfernen von 3'-überhängenden, einzelsträngigen DNA-Enden durch T4 DNA-Polymerase**

Für bestimmte Anwendungen, z. B. der Ligierung von DNA-Fragmenten (s. u.) mit nicht kompatiblen Enden, ist es notwendig, doppelsträngige, glatte Enden („blunt ends“) zu erzeugen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dazu das Enzym DNA-Polymerase des Bakteriophagen T4 verwendet. Das Enzym besitzt zwei unterschiedliche Aktivitäten: In der Gegenwart von Deoxyribonukleosidtriphosphaten (dXTP) katalysiert es die Polymerisation an verkürzten Hydroxylenden von DNA-Fragmenten. Dadurch lassen sich 5'-überhängende, einzelsträngige DNA-Enden zu doppelsträngigen, glatten Enden auffüllen.

In Abwesenheit von dNTPs besitzt die Polymerase eine sehr aktive, einzelstrangspezifische 3'-5'-Exonuklease-aktivität, wodurch sich 3'-überhängende Enden entfernen lassen. Die Reaktion findet in einem Volumen von 20-



50 µl 1x T4-Reaktionspuffer für 30 min bei 37°C statt. Zur Auffüllreaktion werden dem Ansatz 0,1 pmol dNTPs zugegeben.

### 3.4.3 Dephosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Fragmenten durch alkalische Phosphatase

Zur Vermeidung unerwünschter Ligations-Nebenreaktionen, z.B. Religierungen geschnittener 'Vektor'-DNA-Fragmente und zur Vorbereitung von Fragmenten für die radioaktive Endmarkierung (s. u.) werden 5'-Phosphat-Enden der DNA entfernt und somit 5'-hydroxylierte Enden erzeugt. Hierbei wird 1-10 pmol DNA bei 37°C für 15 min („blunt ends“: 60 min) in 20-50 µl einfach konzentriertem Reaktionspuffer mit 1 unit alkalischer Phosphatase (SAP für „shrimp alkaline phosphatase“) inkubiert. Bevor die Fragmente für Ligierungen oder die Endmarkierung eingesetzt werden können, muss das Enzym durch 15min Erhitzen bei 65°C inaktiviert werden.

### 3.4.4 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Um DNA-Fragmente bzw. Oligonukleotide mit Polynukleotidkinase (s. o.) radioaktiv zu markieren, wird als Phosphatgruppendonator  $\gamma(^{32}\text{P})\text{-dCTP}$  (ca. 5000 Ci/µMol, 2pmol/ml) verwendet. Alternativ können einzelsträngige, 5'-überhängende DNA-Enden durch T4 DNA-Polymerase (s. o.) in der Gegenwart eines  $\alpha(^{32}\text{P})\text{-dXTPs}$  aufgefüllt werden.

Nicht inkorporierte Radionukleotide werden direkt nach der Phenolextraktion durch Gelfiltration über eine Sephadex G50-Säule abgetrennt. Alternativ kann die nicht eingebaute Radioaktivität über ein Polyacrylamid-Gel quantitativ abgetrennt werden. Die DNA-Fragmente werden dann aus dem Gel elektroeluiert. Die spezifische Aktivität der radiomarkierten DNA-Fragmente wird schließlich im Szintillationszähler (Cerenkov-Counts) bestimmt.

### 3.4.5 Kovalentes Verknüpfen von DNA-Fragmenten durch T4 DNA-Ligase

Das Enzym DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphoryltermini doppelsträngiger DNA. Eine Einheit des Enzyms (1u) ist definiert als die Ligase -Menge, die notwendig ist, um die Konversion von 1 nmol  $^{32}\text{P}_i$  in ATP bei 37°C in 20 min zu katalysieren (Weiss-unit).

Standard-Ligationen werden in einem Volumen von 10-20µl 1x Ligasepuffer durchgeführt. Die Ligasekonzentration beträgt üblicherweise 1-2u/20µl. Für Klonierungen wird das zu inserierende Fragment in einem 3-5 fachen molaren Überschuss im Verhältnis zum Vektor eingesetzt. Die Inkubationsdauer beträgt mind. 4 h bei RT, alternativ dazu kann die Ligierung auch bei 16°C über Nacht stattfinden. Für Elektroporationen wird die DNA entweder durch Zugabe des gleichen Volumens 5 M Ammonium-Acetat und dem 5-fachen Volumen Ethanol gefällt, zweimal mit 75%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen oder gegen H<sub>2</sub>O dialysiert. Für die Elektroporation werden gewöhnlich nur 1-2 µl eingesetzt, für CaCl<sub>2</sub> - Transformationen kann die DNA (1-10µl) direkt aus dem Ligationsansatz verwendet werden. Die Ligationsreaktion zur Herstellung der BAC-Bank fand bei 16° über Nacht in einem Volumen 50µl statt.

### 3.4.6 Amplifizierung von DNA-Fragmenten in der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) kann selektiv eine DNA-Sequenz *in vitro* amplifiziert werden. Die Synthese wird dabei an zwei „Primern“ gestartet, die so gewählt sind, dass sie den zu amplifizierenden Bereich flankieren. Die PCR wird in einem sog. Thermocycler durchgeführt und besteht prinzipiell aus drei Schritten, deren einzelne Parameter für die jeweiligen „Template-Primer“-Kombinationen individuell optimiert werden müssen.

Der initiale Prozess ist die thermische Denaturierung der DNA in ihre Einzelstränge bei über 90°C für 15 sec bis 2 min. Nach dem Abkühlen des Reaktionsansatzes auf 45-65°C können die Primer sequenzspezifisch an die DNA-Matrize hybridisieren. Schließlich erfolgt beim Temperatur-Optimum der thermostabilen DNA-Polymerase (72-74°C) die DNA-Neusynthese ausgehend von den 3'-OH-Enden der beiden hybridisierten Primer (Saiki *et al.* 1988).

Dieser Zyklus wird je nach den Erfordernissen bis zu 35-mal wiederholt. Das amplifizierte DNA-Fragment wird final durch Gelelektrophorese analysiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die PCR zur Isolierung und Klonierung von DNA-Sequenzen oder zur Genotypisierung von Mäusen eingesetzt. Die verwendeten Primer besaßen z.T. Schnittstellen für Restriktionsenzyme, wodurch sich DNA-Fragmente mit definierten Enden erzeugen ließen.

Zur Amplifikation von Plasmid-DNA wurden folgende Rahmenbedingungen gewählt:

- 0,1-0,5µg Plasmid-DNA
- 30pmol pro Primer
- 25mM für jedes Desoxyribonukleotid
- 5µl 10x Reaktionspuffer (1,5mM MgCl<sub>2</sub>)
- 0,5 - 1,5 units DNA-Polymerase

Der Mix aus Matrizen-DNA, Primern, Desoxyribonukleotiden und 10xReaktionspuffer wird mit milliQ H<sub>2</sub>O auf 50µl Endvolumen aufgefüllt und erst am Ende 0,5-1,5 U einer geeigneten DNA-Polymerase zugegeben.

Durchführung einer Standard PCR:

- Thermische Denaturierung: 30 sec bei 95°C
- Hybridisieren der Primer: 60 sec bei 55°C
- Polymerisation der DNA: 60 sec bei 72°C
- Anzahl der Zyklen: 25-35

Die PCR wird durch eine 5-minütige Inkubation bei 72°C beendet und anschließend ein Aliquot der Reaktion gelelektrophoretisch analysiert. Zur Amplifikation von genomischer Maus-DNA wurden 5-10µl DNA eingesetzt (siehe Aufreinigung genomischer DNA aus Schwanzgewebe der Maus, ca. 200-400ng).

### 3.5 Kultivierung von Säugerzellen

Alle Tätigkeiten, die sich mit der Kultivierung von Zellen befassen, erfordern absolute Sterilität der verwendeten Materialien, Lösungen und Medien. Die Arbeiten wurden ausschließlich in sterilen Werkbänken ('laminar flow hood') durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in befeuchteten Brutschränken mit einer 5%-igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre bei 37°C.

#### 3.5.1 Wachstum von Zellkulturen

##### 3.5.1.1 *Hela Zellen*

Als Kulturmedium wurde komplettes EMEM-Medium, pH 7,3 mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) benutzt.

##### 3.5.1.2 *Gewinnung und Kultur primärer Mausohr-Fibroblasten (MOF-Zellen)*

Primäre Zellkulturen von transgenen Mäusen bieten die Möglichkeit, die Expression des Transgens zu analysieren, ohne dazu das Tier töten zu müssen (z.B. von Stammtieren neuer Linien). Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Protokoll zur Gewinnung primärer Fibroblasten aus der Ohrhaut verwendet, das von Andreas Kistner in unserem Labor etabliert wurde.

Das Gewebe wird zunächst mechanisch zerkleinert und ÜN mit Kollagenase behandelt. Dabei zerfällt der Zellverband und Einzelzellen können danach gewonnen und angewachsen werden. Man erhält zuerst eine Mischpopulation verschiedener Zellarten, wobei nach einigen Tagen in Kultur alle verbliebenen Zellen morphologisch als Fibroblasten zu bezeichnen sind. Die Methode wird wie folgt durchgeführt:

- Abschneiden der Ohrspitze einer Maus mit einer sterilen Schere.
- Zum Transport gibt man das Ohrstück in ein Röhrchen mit RPMI1640-Medium mit 20% FCS, 3x Pen./Strep. Darin kann es auch bei 20-37°C einige Stunden aufbewahrt werden.

- Das Ohrstück wird mit Pinzette und Schere auf einem Objektträger so klein wie möglich zerschnitten, anschließend gibt man die Stückchen in eine 3,5cm Zellkulturschale und gibt 2ml Medium mit 1mg/ml Kollagenase Typ Ia (Sigma) hinzu.
- ÜN bei 37°C im Brutschrank inkubieren.
- Zellen durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren der Suspension vereinzeln und in ein 15ml Röhrchen mit 10ml RPMI-Medium überführen.
- Abzentrifugieren bei 1500rpm für 5 min (Hettich Rotanta/RP).
- Den Überstand abnehmen, das Sediment in 3ml RPMI-Medium (mit 20% FCS, 3x Pen./Strep.) resuspendieren und auf 3,5cm Schalen aussäen.
- Nach 24 h werden die Zellen vorsichtig mit 1xPBS gewaschen und mit frischem Medium versorgt.

Danach expandiert man die Kultur bis zu 80% Konfluenz, bevor man die Zellen weiter umsetzt. MOF-Zellen werden mit Ca-Mg-freiem EDTA abgelöst (siehe unten) und können durch Lipofektion, z.B. mit LipofectAmine (Life Technologies), transfiziert werden. Mit den entsprechenden Methoden (z.B. Luziferasemessung,  $\beta$ -Galatosidase-Färbung, Immunfluoreszenz, „RT-PCR“), ist es so möglich, Informationen über die Aktivität des Transgens in der Maus zu erlangen. MOF-Kulturen wachsen anfänglich sehr gut (ca. 1 Teilung pro 24h), nach etwa 2 Wochen wird die Wachstumsgeschwindigkeit deutlich geringer und nach 4-6 Wochen stellen die Zellen ihr Wachstum ein.

### 3.5.2 Passagieren der Zellen

Die verwendeten HeLa- und Fibroblasten-Zellen wachsen adhärent, als einschichtiger Zellrasen auf dem Boden der Kulturschalen. Um Zellen verdünnt auszusäen oder sie auf mehrere Platten zu verteilen, müssen sie vom Boden der Schale abgelöst werden. Die Zellen haften sich durch Adhäsionsproteine an ihrer Unterlage fest. Diese Interaktion ist, zumindest teilweise, von Kalzium- und Magnesium-Ionen abhängig und kann somit durch EDTA-Zugabe aufgehoben werden. Die Behandlung mit einer  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freien EDTA-Lösung ist daher eine schonende Variante, Zellen von ihrem Untergrund abzulösen. Die Methode ist im Folgenden kurz erläutert:

- Absaugen des Mediums und Waschen der Zellen mit PBS.
- Zugabe der dem halben Volumen des Kulturmediums entsprechenden Menge an  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  freier EDTA-Lösung, Inkubation für 5-15 min, bis sich die Zellen abrunden und beginnen von ihrer Unterlage abzulösen.
- Abspülen der Zellen mit einer Pipette und Überführen der Zellsuspension in ein Schraubdeckelröhrchen entsprechender Größe.
- Sedimentation der Zellen (Zellkulturzentrifuge, 1200 UpM für 5 min bei RT).
- Absaugen des Überstands und Resuspendieren der Zellen in einem geeigneten Volumen Kulturmedium (oder PBS). Zur Bestimmung der Zelldichte kann ein Aliquot der Suspension in der Neubauer-Kammer ausgezählt werden.
- Aussäen der gewünschten Zellmenge auf entsprechende Kulturgefäße.

### 3.5.3 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Um Zellen langfristig zu lagern, werden sie bei -196°C in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dazu werden die Zellen vom Kulturgefäß abgelöst, sedimentiert, in 500  $\mu\text{l}$  eiskaltem FCS resuspendiert, und für 5-10 min auf Eis gestellt. Anschließend gibt man 500  $\mu\text{l}$  eiskaltes EMEM-Medium mit 20% DMSO hinzu. Nach sorgfältigem Mischen wird die Suspension in ein 1ml-Einfriereröhrchen für Zellen überführt. Zunächst erfolgt das Einfrieren bei -80°C, nach 1-2 Tagen werden die Zellen dann in Tanks mit flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen der Zellen werden die Einfriereröhrchen zunächst im Wasserbad inkubiert, bis das Einfriermedium zu schmelzen beginnt, dann durch rasches Mischen mit 500  $\mu\text{l}$  PBS oder Kulturmedium (ohne FCS, um Schaumbildung zu vermeiden) in 10 ml vorgewärmtes Kulturmedium überführt. Die Suspension wird abzentrifugiert, um das für die Zellen toxische DMSO unverzüglich zu entfernen. Die Zellen werden anschließend in Kultur genommen.

### 3.6 DNA-Transfer in Säugerzellen

Die Analyse der Genregulation und Expression erfordert die Methodik, DNA in eine eukaryotische Zelle zu bringen. Dabei kennt man chemische Methoden (DEAE-Dextran- oder Kalzium-Phosphat-Kopräzipitations-Methode), die Verwendung kationischer Lipide (Liposomen-Transfektions-Methode) und physikalische Methoden (Elektroporation, Mikroinjektion). Eine ideale Methode, um DNA-Moleküle in eine Zelle zu transferieren, sollte folgende Kriterien erfüllen: hocheffizienter DNA-Transfer, geringe Toxizität, Reproduzierbarkeit und einfache Durchführbarkeit. Jede der genannten Transfektions-Methoden erfüllt diese Kriterien in unterschiedlichster Weise und hat Vorteile und Limitierungen.

#### 3.6.1 Transiente Kalzium-Phosphat-Transfektion von Plasmid-DNA in Säuger-Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die Transfektion von Plasmiden in HeLa-Zellen eine modifizierte Kalzium-Phosphat-Methode (Graham & Van der Eb, 1973) durchgeführt. Hier geht man davon aus, dass Zellen die DNA als Komplexe aufnehmen (feine Kristalle aus DNA und Kalzium-Phosphat). Einen Einfluss auf die Effizienz der Aufnahme scheinen dabei der pH-Wert des Kulturmediums, die Partikelgröße der Kristalle, die Länge der Inkubationszeit sowie der physiologische Zustand der Zellen zu haben.

Beim Einspritzen kleiner Aliquots von 250 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung (die auch die DNA enthält, mindestens 20  $\mu\text{g/ml}$ ) in das gleiche Volumen 2x HBS-Puffer beginnt die Ausformung kleiner Kalzium-Phosphat-Kristalle, die die DNA mit einschließen. Das Präzipitat soll sich für ca. 30 min bei RT formen, danach wird es auf dem Schüttler kurz gemischt, in das Kulturmedium gegeben und zwischen 20 und 36 Stunden auf den Zellen inkubiert. Routinemäßig werden in eine 3,5 cm Kulturschale 100  $\mu\text{l}$ , in eine 5 cm Schale 200  $\mu\text{l}$ , und in eine 10 cm Schale 500  $\mu\text{l}$  Präzipitat gegeben. 1 Stunde vor Zugabe des Präzipitates sollte das Kulturmedium gewechselt und dessen pH durch Inkubation im 6%  $\text{CO}_2$ -Brutschrank auf 7,2 eingestellt werden. Üblicherweise werden die Zellen nach Beendigung der Transfektion (2-4 h) mit PBS gewaschen, um das Präzipitat zu entfernen. Bei den hier verwendeten HeLa-Zellen ist dies nicht erforderlich.

#### 3.6.2 Transiente „Lipofektion“ von Plasmid- und BAC-DNA in Säuger-Zellen

Zur Transfektion primärer Fibroblasten oder zur Transfektion von „künstlichen Bakterienchromosomen“ (BACs) in HeLa Zellen ist die Kalzium-Phosphat-Methode nicht besonders effizient. Aus diesem Grund wurde hier eine Lipofektion durchgeführt. Bei dieser Methode werden die DNA-Moleküle von lipidartigen Vakuolen eingeschlossen. Nach Zugabe der Lipid-DNA Mischung in das Kulturmedium verbinden sich die Vakuolen mit der Zellwand und die zu transfizierende DNA gelangt in das Cytoplasma. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Produkt Lipofecamine der Firma Invitrogen verwendet. Die Transfektion wird in einem synthetischen Medium ohne FCS durchgeführt (OptiMEM). 6 Stunden nach der Transfektion sollte das OptiMEM-Medium durch OptiMEM mit 20% FCS ausgetauscht werden.

#### 3.6.3 Quantifizierung von Transfektionsexperimenten

##### 3.6.3.1 Herstellung von Zell-Lysaten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sog. Reportergene verwendet, um quantitative Informationen über Aktivität der transkriptionellen Regulationseinheiten, die diese Reportersysteme kontrollieren, zu erhalten (eine Übersicht über Reportergene zur Analyse der eukaryotischen Transkription findet sich in Alam & Cook, 1990). Dazu werden die transfizierten Zellen lysiert und die Zellextrakte mittels biochemischer Reaktionen, die das betreffende Reportersystem katalysiert, analysiert. Die Herstellung der Zell-Lysate ist im Folgenden erläutert:

- Waschen der Zellen in PBS.
- Adhärenz gewachsene HeLa-Zellen werden durch Zugabe von Lysepuffer lysiert. Bei einer 3,5 cm Schale genügen 100  $\mu\text{l}$ , bei einer 6 cm Schale sind 200-250  $\mu\text{l}$  ausreichend.
- Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur.

- Die Zellen werden mit einem Schaber von ihrem Untergrund abgelöst und in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt.
- Zentrifugation des Zell-Lysates in der Tischzentrifuge bei 13000 Upm für 30 sec, um unlösliche Bestandteile zu entfernen.
- Überführen des Überstandes in ein neues Gefäß.

### 3.6.3.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen nach Bradford

Basische Aminosäure-Seitenketten von Proteinen bilden mit Coomassie Brilliant Blue G-250 Komplexe, die in Lösung blau erscheinen. Die Intensität der Färbung ist direkt proportional zu der Menge an Protein im Reaktionsansatz. Das Absorptionsmaximum der Komplexe liegt bei 595 nm. Die Proteinkonzentration einer Proteinlösung kann durch Messung der OD<sub>595</sub> bestimmt werden. Zum entsprechenden Volumen der Proteinlösung werden ad 100 µl H<sub>2</sub>O pipettiert. Von Zell-Lysaten sollen maximal 5 µl eingesetzt werden, da das im Lysepuffer enthaltene Detergenz bei höheren Konzentrationen mit der Komplex-Bildung interferiert und somit das Ergebnis verfälscht. Anschließend gibt man 900 µl der Bradford-Reagenz hinzu und inkubiert den Ansatz für 20-30 min bei Raumtemperatur. Die Messung der OD<sub>595</sub> erfolgt im Spektralphotometer. Die Proteinkonzentration wird schließlich durch den Vergleich mit einer Eichkurve, die aus Verdünnungen eines Protein-Standards (z.B. humanes Serumalbumin) erstellt wurde, ermittelt.

### 3.6.3.3 Das Luziferase-Reportersystem

Das Luziferasegen des Leuchtkäfers *Photinus pyralis* kodiert das Enzym Luziferase (deWet *et al.*, 1987). Dieses Enzym katalysiert in Anwesenheit von Magnesium-Ionen und unter ATP-Hydrolyse die oxidative Carboxylierung von D-Luziferin zu Oxoluziferin. Als Folge dieser Reaktion werden Photonen (der Wellenlänge 562 nm) freigesetzt, die sich in einem Bioluminometer quantifizieren lassen. Dabei ist die Menge der erzeugten Photonen direkt proportional zur Menge an Luziferase, solange sich das Substrat im Überschuss befindet. Diese lineare Korrelation existiert über einen Messbereich von über fünf Größenordnung; dabei kann das Expressions-niveau des Gens quantitativ gemessen werden. Ein weiterer Vorteil des Luziferase-Reportersystems ist seine extrem hohe Empfindlichkeit.

Die Luziferaseaktivität wird in Extrakten transfizierter Zellen nachgewiesen und sei im Folgenden kurz beschrieben:

- 10 µl Zelllysats (s.o.) werden in 250 µl Luziferase-Meßpuffer pipettiert.
- Die Probe wird im Bioluminometer (z. B. BioLumat 9051, Fa. Berthold) nach automatischer Injektion des Substrates (100 µl einer wässrigen 125 mM Luziferin-Lösung) vermessen.
- Das emittierte Licht wird von einem „Photomultiplier“ (Messbereich von 390-620 nm) über 10 sec gemessen, integriert und als relative Lichteinheiten (rlu) angegeben.

### 3.6.3.4 $\beta$ -Galaktosidase als Reporter in der Zellkultur

Das *lacZ* Gen von *E. coli* lässt sich bei Verwendung von entsprechenden Transkriptionssignalen in eukaryotischen Zellen exprimieren. Es katalysiert die  $\beta$ -glykosidische Spaltung von Laktose (und zum Teil deren Analoga) in Monosaccharide. Zur Analyse der Enzymaktivität kommen zwei Substrat-Analoga zum Einsatz, deren Spaltung zur Freisetzung chromophorer Gruppen führt:

- Aus ONPG wird lösliches o-Nitrophenol freigesetzt, das sich bei 420 nm spektralphotometrisch quantifizieren lässt.
- Bei der Spaltung von X-Gal entsteht 5,5'-Bibromo-4,4'-dichloro-Indigo, ein blauer, nicht wasserlöslicher Farbstoff.

a) Quantifizierung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in Extrakten transfizierter Zellen:

- In einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß werden 20-50 µl Zelllysats (s.o.) ad 100 µl H<sub>2</sub>O aufgefüllt, und mit 700 µl Z-Puffer (incl. 50 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) versetzt.

- Zugabe von 200 µl ONPG, Mischen, Inkubation bei 37°C, bis Gelbfärbung eintritt (wenige min bis mehrere h).
- Bestimmung der OD<sub>420</sub> (und OD<sub>550</sub>) im Spektralphotometer.

b) In situ  $\beta$ -Galaktosidase-Test zur Bestimmung der Transfektionseffizienz:

Diese Methode erlaubt eine direkte Bestimmung des Anteils transfizierter Zellen durch Auszählen unter dem Mikroskop.  $\beta$ -Galaktosidase-produzierende Zellen spalten X-Gal, wodurch ein blauer Indigo-Farbstoff in den Zellen präzipitiert.

- Nach der Transfektion wird die Kulturschale 3x mit PBS gewaschen. Danach werden folgende Schritte durchgeführt:
- Fixieren der Zellen mit 3,7% Formaldehyd in PBS, Inkubation für 3 min bei RT.
- 3x Waschen mit PBS.
- Permeabilisieren der Zellen mit vorgekühltem (-20°C) 50%igen Methanol für 5 min bei -20°C.
- 3x Waschen mit PBS.
- Inkubation in Färbelösung ohne X-Gal für 5 min bei RT.
- Inkubation in Färbelösung mit X-Gal bei 37°C, bis eine deutliche Blaufärbung der Zellen eintritt.
- Bestimmung des Verhältnisses von blauen zu ungefärbten Zellen zur Ermittlung der Transfektionseffizienz.

Bei dieser Methode ist zu beachten, dass die vorgegebenen Inkubationszeiten mit Formaldehyd und Methanol nicht überschritten werden, da so die enzymatische Aktivität der beta-Galaktosidase zerstört werden kann. Es ist unter allen Umständen der Einsatz von Aceton-haltigen Permeabilisierungslösungen zu vermeiden.

### 3.7 Etablierung stabil transfizierter Zelllinien

Für viele biologische Fragestellungen ist es nötig, über Zelllinien zu verfügen, die Kopien eines fremden Gens mit geeigneten Regulationselementen stabil in ihrem Genom integriert tragen. Die Integration linearisierter Plasmid-DNA erfolgt ohne offensichtliche Präferenz bestimmter Integrationsorte im Genom, d.h. sie ist statistisch verteilt. Die Anzahl der Kopien pro Genom ist variabel. Essentiell für die Methode ist, dass man über einen geeigneten Marker verfügt, mit dem sich die Zellen selektionieren lassen, die die DNA aufgenommen und integriert haben. Dabei verwendet man häufig Resistenzgene gegen toxische Substanzen. Das resistenzvermittelnde Gen kann sich auf dem gleichen Plasmid wie das zu exprimierende Gen befinden, oder es wird mit dem zu untersuchenden Gen kotransfiziert. Dabei wird ein hoher Überschuss der Zielgen-DNA eingesetzt und davon ausgegangen, dass jede Zelle, die einen Marker-DNA-spezifischen Phänotyp zeigt, auch die zu untersuchende DNA im Genom integriert trägt. Die Vorgehensweise ist nachfolgend beschrieben:

- Zellen in einer etwa 50% konfluenten 35 mm Kulturschale werden mit ca. 4 µg linearisierter Plasmid-DNA transfiziert. (Das Verhältnis von Marker-Plasmid zum fremden Gen sollte hierbei etwa 1:30 betragen)
- Nach gründlichem Waschen der Zellen mit PBS werden diese am darauf folgenden Tag abgelöst und auf zwei 10 cm Kulturschalen verteilt.
- Man lässt die Zellen für 2h anwachsen und gibt erst dann das entsprechende Antibiotikum ins Medium, über die Dauer der Selektion sollte es ca. alle 3 Tage erneuert werden
- Nach 1-2 Wochen sind alle nicht resistenten Zellen abgestorben und stabil transfizierte Klone als Kolonien erkennbar.

Um Klone zu isolieren und anschließend separat zu expandieren, werden die Zellen zunächst mit PBS gründlich gewaschen, dann mit Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-freiem -EDTA für etwa 2-3 min inkubiert. Die Zellen sollen sich gerade abrunden, nicht jedoch von ihrer Unterlage ablösen.

Mit einer 20 µl Eppendorf-Pipette, die auf 10 µl eingestellt wurde, zieht man ca. 5 µl Medium an und setzt dann die Pipettenspitze auf die Kolonie. Durch sehr vorsichtiges Auf- und Abpipettieren werden die Zellen abgelöst und in 24-Loch-Zellkulturplatten transferiert, wo sie weiter unter Selektionsdruck expandiert werden. Die im Rahmen dieser Arbeit etablierten HeLa-Zelllinien wurden auf Hygromycin B-Resistenz hin selektioniert. Die eingesetzte Konzentration an Hygromycin B betrug 300 µg/ml.

### 3.8 Biolumineszenz-Analyse zur Identifikation Luziferase-synthetisierender Zellen *in vivo*

In dieser Arbeit wurde eine Methode verwendet, die *in vivo* und sehr effizient die Identifikation von Zellen erlaubt, die das Luziferase-Gen unter der transkriptionellen Kontrolle von tTA/rtTA stabil exprimieren. Hierbei können die Zellen in Form von resistenten Kolonien (im Durchmesser etwa 1-6 mm), wie sie nach einer stabilen Transfektion und anschließender Selektion gewachsen sind, auf die Luziferaseaktivität analysiert werden. In absoluter Dunkelheit können die von positiven, d.h. Luziferase-synthetisierenden Kolonien emittierten Photonen über ein hoch lichtempfindliches CCD-Kamerasystem (Hamamatsu ICCD C2400-47) detektiert werden. Die CCD-Kamera ist dabei mit einem lichtstarken Objektiv (z.B. Nikon, 35mm/f1.2) verbunden, in dessen Bildebene sich Kulturschale befindet. Der optische Detektor des Systems ist der CCD-Imager, ein Metalloxyd-Halbleiter, der aus mehreren Millionen Bildelementen (Pixels) aufgebaut ist, die ihrerseits eine photoneninduzierte Ladung akkumulativ speichern können. Nachdem in den einzelnen Pixeln eine ausreichende Ladungsmenge akkumuliert ist, wird die gespeicherte Information des Chips ausgelesen, amplifiziert und an einen Rechner weitergeleitet, der eine Lumineszenzabbildung des Objektes darstellt. Diese Abbildung lässt sich im Folgenden digital z.B. mit einem Argus 20 Image Prozessor von Hamamatsu weiter verarbeiten (z.B. Hintergrundbearbeitung oder Darstellung in Pseudofarben). Die Lumineszenzabbildung kann rechnerisch mit der bei Tageslicht erstellten Aufnahme der Kulturschale überlagert werden, wodurch sich positive Kolonien identifizieren lassen.

Zur Lumineszenz-Analyse wird das Medium über den Kolonien abgenommen und durch 1/4 des Ausgangsvolumens einer Mischung von PBS ersetzt, welches 1/3 komplettes E-MEM, 10 mM HEPES pH 7,05 und 100 µM Luziferin enthält. Die Zellen können nach einer Inkubation von 5-10 min zur Messung eingesetzt werden. Das verwendete Luziferin erwies sich dabei als membrangängig. (modifiziertes und dadurch membrangängiges Luziferin ist kommerziell erhältlich). Die Belichtungszeiten zur Erstellung einer Lumineszenzabbildung der Kolonien lagen zwischen 10 und 15 min. Zu einer Aufnahme der Schale bei künstlicher Beleuchtung genügten 0,5 Sekunden. Positive identifizierte Kolonien werden dann durch  $\text{Ca}_{2+}/\text{Mg}_{2+}$ -freies PBS von der Kulturschale abgelöst und können isoliert expandiert werden.

Die gleiche Methode kann auch zur Analyse transgene Mäuse angewandt werden (Hazan *et al.*, 2001). Dazu müssen die entsprechenden Luziferase-exprimierenden Mäuse mit Avertin betäubt werden. Da narkotisierte Mäuse schnell auskühlen, sollten sie immer wenn möglich für die Dauer der Narkose auf einer Wärmeplatte liegen. Damit die auch während der Betäubung geöffneten Augen nicht austrocknen, sollten handelsübliche Augentropfen aufgetragen werden. Danach injiziert man ihnen das Substrat als 100µg/g Luziferin Lösung in Wasser (ca. 200µl). Ein paar Minuten später, in denen sich das Luziferin im Körper der Maus verteilen konnte, werden die Mäuse in die Dunkelkammer gelegt, sodass die emittierten Photonen von der CCD-Kamera aufgenommen werden können. Die Dauer der Exposition ist im Normalfall eine Minute, kann jedoch für schwach exprimierende Tiere bis zu 10 Minuten ausgeweitet werden.

### 3.9 Haltung und Herstellung von transgenen Mäusen

#### 3.9.1 Haltung von Mäusen als Versuchstiere

Versuchstiere müssen laut Tierschutzgesetz in dafür vorgesehenen Räumen gehalten werden. Im Rahmen dieser Arbeit geschah dies in der Versuchstierhaltung (VTH) des ZMBH. Die dort herrschenden Bedingungen entsprechen den gängigen Anforderungen an die moderne Tierpflege. Die für Mäuse geeigneten Räume sind konstant klimatisiert mit einer Temperatur von 20-22°C und einer relativen Luftfeuchte von ca. 50%. Feste Hell-Dunkel-Phasen (Tag: 6-18 Uhr) ermöglichen den Mäusen einen konstanten Biorhythmus. Je nach ihrer Größe und den experimentellen Erfordernissen wurden die Mäuse in Makrolon-Käfigen vom Typ II oder Typ III auf Weichholzgranulat gehalten. Das Futter (Altromin: Zucht- oder Standardfutter) und autoklaviertes Trinkwasser

standen „ad libidum“ zur Verfügung. Durch strenge Hygiene und monatliche raumspezifische Kontrollen ist die VTH des ZMBH als quasi spezifisch pathogenfrei (SPF) anzusehen. Wenn für die Transgenproduktion, Zuchten, pharmakologische Studien oder sonstige Kontrollen nicht-transgene („wt“)-Mäuse benötigt wurden, kamen die Mäuse entweder von der Fa. Charles River, Deutschland in Hannover oder aus der Eigenzucht der VTH.

### 3.9.2 Applikation von Tetrazyklinen

Generell existieren mehrere Möglichkeiten der Tetrazyklin-Applikation in der Maus, die zur Regulation des Tet-Systems verwendet werden können: Futter, Trinkwasser, *i.p.*-Injektionen oder Pellets zur Implantierung. Die optimale Induktor-Gabe sollte eine möglichst gleich bleibende Konzentration im Tier über einen längeren Zeitraum gewährleisten und ohne hohen experimentellen Aufwand durchzuführen sein. Üblicherweise werden die Tetrazykline über die orale Aufnahme durch das Trinkwasser oder im Futter verabreicht, für kurzzeitige Experimente mit definiertem Beginn sind auch *i.p.*-Injektionen hilfreich. Die Induktor-Gabe im Futter oder als Pellets, die z.B. unter die Nackenhaut implantiert werden, wurde in unserem Labor ebenfalls getestet, führte aber nicht zu befriedigenden Ergebnissen.

Im allgemeinen wird zur Genkontrolle Doxyzyklin-Hydrochlorid (Dox) benutzt, ein wasserlösliches Tetrazyklin-Derivat. Es ist für Tränkungsexperimente besonders geeignet, da Dox im Gegensatz zu anderen Tetrazyklinen in ihrer Resorption nicht von gleichzeitiger Nahrungsaufnahme gehemmt wird, und außerdem als viel benutztes Derivat sowohl beim Menschen als auch in Versuchstieren pharmakologisch gut erforscht wurde (Hlvaka & Boothe, 1985). Normalerweise werden Doxyzyklin-Lösungen in einer Konzentration von 0.2-2mg/ml in vollentsalztem Wasser mit 5% Zucker verabreicht (bei der Verwendung von normalem Leitungswasser bildet sich ein flockiges Präzipitat in der Flasche, ohne Zuckerzusatz wird das Dox-Wasser von den Mäusen schlecht angenommen, siehe dazu auch A. Kistner, Dissertation Uni Heidelberg). Generell sollten braune Trinkflaschen verwendet werden, da Tetrazykline lichtempfindlich sind. Um Pilz- oder Bakterien-Kontaminationen zu vermeiden ist es ratsam, das Dox-Wasser alle 3-4 Tage zu wechseln.

#### 3.9.2.1 Doxyzyklin-Konzentrationen im tTA-System

Im tTA-System ist die Genexpression ohne Induktor angestellt, mit dem Verabreichen des Antibiotikums kommt die Transkription zum Erliegen. Bei Anwendungen des tTA-Systems ist zu beachten, dass das System extrem empfindlich auf die Doxyzyklin-Gabe reagiert. So können z.B. schon 2 µg Dox/ml Trinkwasser ausreichen, um in doppelt transgenen Tieren die Expression in der Leber auf Hintergrundniveau zu bringen (Linien TA<sup>LAP</sup>-2/LC-1). Dies ist 100-1000fach sensitiver als das reverse System. Nach der Geburt bildet sich die Blut-Hirnschranke, eine effiziente Barriere für viele Substanzen zwischen Gehirn- und Körper-Blutkreislauf. Sie verhindert z.B. das Eindringen von toxischen Substanzen aus dem Blut ins Gehirn - und damit auch leider die Penetranz eines Großteils des Induktors Doxyzyklin. Aus diesem Grund sollte zum „Abschalten“ des tTA-Systems im Gehirn von adulten Mäusen 2mg/ml Dox im Trinkwasser verwendet werden.

Die Menge und Dauer der Induktor-Gabe muss gut überlegt sein, soll das Zielgen später nochmals angeschaltet werden. Eine effektive Induktion wird erst stattfinden, wenn sich im Körper der Maus die Konzentration des Doxyzyklins ausreichend reduziert hat. Für die Dauer dieses Prozesses ist die biologische Halbwertszeit des verwendeten Tetrazyklin-Derivats im Zielorgan, die Dauer und die Konzentration bei der Fütterung entscheidend. Bei hoher Dosierung können sich Dox-Depots bilden, was eine Reinduktion aufgrund der hohen Sensitivität von tTA gegenüber dem Antibiotikum verhindert oder sehr lange Zeit in Anspruch nimmt.

Besondere Vorsicht ist geboten, wenn man Mäusen während der Schwangerschaft Doxyzyklin im Trinkwasser verabreicht. Das Antibiotikum kann effektiv die Plazenta passieren, weshalb schon Konzentrationen von 50 µg/ml ausreichen, um auch in den Embryos das System in allen Organen, einschließlich dem Gehirn, zu unterdrücken (H. Krestel, persönliche Mitteilung). Tetrazykline sind starke Chelat-Bildner und können mit Kalzium Orthophosphatkomplexe ausbilden. Gibt man der Mutter höhere Dosen, so wird sich das Doxyzyklin in kalziumhaltigen Geweben, wie z.B. Knochen und Zähnen des sich entwickelnden Embryos ablagern (Böcker *et al.*, 1984, Sande & Mandell, 1990). Von diesen Depots kann es dann noch Tage bis Wochen nach Dox-Entzug in den Kreislauf diffundieren, und so die effektive Induktion verhindern.



### 3.9.2.2 Doxyzyklin-Konzentrationen im rtTA –System

Im rtTA-System werden relativ hohe Konzentrationen des Induktors benötigt, weshalb man auf die Gabe von 2mg/ml im Trinkwasser angewiesen ist (Kistner *et al.*, 1996; Gunther *et al.*, 2002). Bei nur kurzer Fütterungsdauer ist zu beachten, dass Mäuse individuell unterschiedliche Trinkgewohnheiten besitzen. Will man das System nur relativ kurz aktivieren, kann man diese Problematik umgehen, indem *i.p.*-Injektionen von Dox Lösungen in 0,9 % NaCl verwendet werden. Hierzu werden 4mg Dox in 1 ml 0,9% NaCl (steril) gelöst, von dieser Lösung können bis zu 0,5 ml täglich injiziert werden.

Durch die Identifizierung neuer Mutanten des Tet-Repressors ist es inzwischen gelungen, die Sensitivität gegenüber Dox um das 10fache zu verbessern (Urlinger *et al.*, 2000). Die Transaktivatorvariante mit diesen Eigenschaften wird kurz als „M2“ bezeichnet, sie konnte aber in dieser Arbeit noch nicht eingesetzt werden. Auch im reversen System stellt die Induktion im Hirn aufgrund der Filter-Funktion der Blut-Hirnschranke eine eigene Problematik dar. Es ist in diesem Organ wahrscheinlich nicht möglich, eine Sättigung des Systems mit Doxyzyklin über die Gabe im Trinkwasser zu erreichen.

### 3.9.3 DNA-Transfer in die Keimbahn von Mäusen

Die Keimbahnmanipulationen zur Herstellung transgener Mäuse wurden, soweit nicht anders vermerkt, von F. Zimmermann und Sascha Dlugosz in der TGE der ZMBH durchgeführt. Zu den Details dieser komplexen Technik siehe Hogan *et al.*, 1994. Hier soll nur ein knapper Überblick über das Prinzip gegeben werden:

Befruchtete Eizellen (C57Bl/6 x DBA-2 F1-Hybride) werden in ausreichender Zahl durch die Verpaarung superovulierter Spenderweibchen mit Männchen gewonnen. Am nächsten Tag werden die Weibchen getötet und die befruchteten Eizellen aus ihren Eileitern gespült. Die Eier werden in 15 µl M2 Medium auf einen Objektträger („depression slide chamber“) mit Parafinöl überschichtet. Die Injektion von DNA erfolgt in den männlichen Vorkern der befruchteten Eizellen. Die überlebenden Zygoten werden in die Ovidukte von scheinchwangeren Empfängerweibchen transferiert.

Die Frequenz der transgenen Tiere (Stammtiere) unter den daraus hervorgehenden Mäusen schwankt zwischen 5-30%. Diese werden durch PCR- oder „Southern Blot“-Analyse auf die Integration des Transgens ins Genom untersucht.

### 3.9.4 Betäubung von Mäusen mit Avertin

Für einige Experimente (z.B. *in vivo*-Detektion der Luziferase Expression, Transfer von Oozyten) ist es notwendig Mäuse für eine kurze Zeit zu betäuben. Dies kann relativ einfach durch eine intraperitoneale (*i.p.*) Injektion einer Avertin-Lösung geschehen. Um eine Betäubung für eine Dauer von ca. 15 bis 30 min zu erreichen, werden den Mäusen 20µl pro g Körpergewicht injiziert. Den Mäusen sollte kurz nach Injektion Augentropfen appliziert werden, um ein Austrocknen der während der Narkose geöffneten Augen zu verhindern. Da Mäuse auch sehr temperaturempfindlich sind, ist es ratsam, sie während dieser Zeit auf eine Wärmeplatte zu legen.

### 3.9.5 Aufreinigung und Analyse von mRNA aus Lebergewebe der Maus

Zur RNA-Präparation wurde in dieser Arbeit das RNeasy Mini Kit von Qiagen verwendet. Dazu wurden ca. 30mg tiefgefrorenes Lebergewebe mit einem Ultra-Turrax (IKA, T25) homogenisiert und die Gesamt-RNA über eine Säule aufgereinigt. Die Aufreinigung wurde wie folgt durchgeführt:

- Zu 30mg Gewebe werden 600µl Puffer RLT in einem 2ml-Reaktionsgefäß zugegeben.
- Homogenisieren der Gewebeprobe auf Eis für ca 10 sec.
- Zentrifugieren der homogenisierten Probe für 3 min bei 14.000 Upm in einer Tischzentrifuge
- Transfer des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß.
- Zugabe von 600µl 70%igem Ethanol, Mischen durch Pipettieren.

- Auftragen von bis zu 700µl der Probe auf ein RNeasy-Säulchen und Zentrifugation für 15 sec bei 10.000 Upm.
- Waschen des Säulchens mit 350µl Puffer RW1 durch Zentrifugation für 15 sec bei 10.000 Upm.
- DNase-Verdau auf der Säule mit 80µl DNase-Lösung (Quiagen) für 15 min bei RT.
- Erneutes Waschen des Säulchens durch Zugabe von 350µl Puffer RW1 und Zentrifugation für 15 sec bei 10.000 Upm.
- Waschen mit 500µl Puffer RPE, erneute Zentrifugation wie oben.
- Waschen mit 500µl RPE-Lösung, Zentrifugation für 2 min bei 10.000 Upm.
- Elution der RNA mit 50µl DNase-freiem Wasser (Zentrifugation für 1 min bei 10.000 Upm)

Die Ausbeute an RNA beträgt zwischen 30 und 150 µg. Die RNA sollte vor dem Einsatz in RT-PCR-Anwendungen auf chromosomale DNA-Verunreinigungen getestet werden.

Für die Analyse der Genexpression auf mRNA-Ebene durch reverse Transkription und PCR (RT-PCR) wurden 1µg der Gesamt-RNA aus der Leber verwendet. Die Enzyme für die reverse Transkription und die anschließende PCR wurden von der Firma Qiagen bezogen („One Step RT-PCR Kit“). Die Konzentration der eingesetzten Primer (Luziferase, Cre und Synthetischer TetR) betrug 0,3 µM, zusätzlich wurde zu der Reaktion noch 0,25 µl RNasin (ein RNase-Inhibitor) pro Reaktion eingesetzt.

*Reaktionsbedingungen der RT-PCR:*

- Reverse Transkription : 30 min at 50°C
- Initiale PCR Aktivierung: 15 min at 95°C
- Zyklen: 21 x 30 sec at 94°C  
1 min at 55°C  
30 sec at 72°C

Die Amplifikationsprodukte wurden auf ein 2,5%iges Agarose-Gel aufgetragen und nach der Elektrophorese mit SYBER-Green im Gel angefärbt. Anschließend wurde die Intensität der Fluoreszenz der Banden durch einen Fluoro-Imager eingelesen und mit dem Programm Image Quant von Molecular Dynamics quantifiziert. Zur Normierung der Luziferase bzw. Cre-Werte wurde die Intensität der rtTA2<sup>S2</sup>-Bande bestimmt.

### 3.9.6 Extraktion von Mausorganen für den Luziferasetest

- Tötung der Maus durch „Strecken“ (Genickbruch) und Präparation der inneren Organe.
- Waschen der Organe / Organteile in 1xPBS und Überführen in ein 2ml Röhrchen mit 500µl Lysepuffer auf Eis.
- Homogenisierung des Organs mit einem speziellen „Mixer“ (Ultraturax T25, Janne & Kunkel) für 5-15sec.
- Einfrieren der Extrakte in flüssigem Stickstoff zum weiteren Aufschluss des Gewebes. Die Lagerung kann für wenige Tage bei -80°C erfolgen.
- Nach dem Auftauen werden die Extrakte für 5min bei 13000Rpm in der Tischzentrifuge abzentrifugiert, der Überstand in ein frisches Röhrchen überführt und die Luziferaseaktivität gemessen.

Bei der Entnahme der Organe von neugeborenen Mäusen (bzw. Tag 7, 14 und 35 nach der Geburt) wurden diese für 10 sec in 100µl Lysepuffer sonifiziert. 10µl des Lysats wurden zur Luziferasemessung eingesetzt.

### 3.9.7 In situ-β-Galaktosidase-Nachweis in Mäusegeweben

Trägt eine transgene Maus eine lacZ-Expressionseinheit, so kann die Enzymaktivität in fixierten Geweben und in Gefrierschnitten von Organen oder Embryonen durch Blaufärbung der exprimierenden Zellen analysiert werden. Dadurch können beispielsweise die Gewebespezifität und die Expressioncharakteristika von Promotoren untersucht werden. Da der Nachweis bei physiologischem pH durchgeführt wird, findet man endogene β-

Galaktosidaseaktivität nur nach langer Inkubation, da ihr Aktivitätsoptimum bei pH4 liegt. Die Methode wurde wie folgt durchgeführt:

- Nach Tötung der Maus und der Entnahme der Organe werden diese kurz auf Eis mit 1xPBS gewaschen.
- Das Gewebe wird in einer Lösung von 4% Paraformaldehyd in 1xPBS fixiert.
- Inkubation in einer 30%igen Succrose-Lösung in 1x PBS, bis das Gewebe absinkt
- Zum schonenden Einfrieren wird das Organ auf eine Alufolie auf Trockeneis gesetzt. Es friert so langsam von unten nach oben durch
- im Kryostat werden bei -14°C 10-20µm dicke Gefrierschnitte hergestellt und auf positiv geladene Objektträger (SuperFrost, Menzel-Gläser) aufgezogen.
- Nach dem Lufttrocknen werden die Schnitte mit X-Gal Färbelösung überschichtet, abgedunkelt und bei RT solange inkubiert, bis eine Blaufärbung eintritt.
- Die Schnitte werden 3x5min in 1xPBS und 1x2min in H<sub>2</sub>O gewaschen und für 3-6min in Kernecht-Rot-Lösung gegengefärbt. Anschließend werden sie für 3x 5min in H<sub>2</sub>O gewaschen.
- Die Schnitte werden auf einem Heizblock (60°C) mit Glycerin-Gelatine (auf 60°C erwärmt) unter einem Deckgläschen eingebettet.

### 3.9.8 Immunperoxidase-Färbung von Gewebeschnitten

Methode nach Hsu *et al.* (1981): Bei der Immunperoxidase-Färbung werden Proteine in fixierten Zellen durch spezifisches Anfärben sichtbar gemacht. Zunächst wird in den fixierten Gewebeschnitten die eventuell vorhandene endogene Peroxidase-Aktivität durch die Behandlung mit Wasserstoff-Peroxid eliminiert. Danach werden sie mit einem für das zu detektierende Protein spezifischen Antikörper behandelt. In einem zweiten Schritt wird dieser Primärantikörper über einen biotinylierten Sekundärantikörper gebunden. Durch die Zugabe eines Avidin/biotinylierten Peroxidase-Komplexes wird das Peroxidase-Enzym an dem Zielprotein lokalisiert. Die Peroxidase vermittelt im letzten Schritt eine Farbreaktion, bei der Diaminobenzidine-Tetrahydrochlorid (DAB) umgesetzt wird, das unter dem Mikroskop als brauner Niederschlag in den Zellen sichtbar wird.

Die Methode wird hier an Hand der Immunofärbung gegen die Cre-Rekombinase dargestellt, der Primärantikörper wurde von der Arbeitsgruppe G. Schütz zur Verfügung gestellt. Alle Schritte erfolgen bei Raumtemperatur:

Die Gewebeschnitte (15-50µm) werden auf positiv geladene Objektträger aufgezogen und für ca. eine halbe Stunde luftgetrocknet. Anschließend erfolgt eine Inkubation mit Wasserstoffperoxid für ca. 10 min bei RT (1 ml 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 60 ml PBS). Um eine unspezifische Bindung des Zweitantikörpers zu reduzieren, werden die Schnitte für mind. 20min mit einer 2%igen Serum-Lösung (in 1x PBS/1% BSA/0,3% Triton X-100) behandelt. Im nächsten Schritt wird der erste Antikörper (in 1x PBS/1% BSA/0,3% Triton X-100) auf die Schnitte gegeben, die Bindungsreaktion kann über Nacht geschehen. Um ungebundene Antikörper zu entfernen, wird 2x kurz mit 1x PBS/0,3% BSA/0,1% Triton X-100 gewaschen, bevor die Schnitte für 1 Stunde mit dem zweiten Antikörper (in 1x PBS/0,3% BSA/0,1% Triton X-100) inkubiert werden. Um auch überschüssige Zweitantikörper zu entfernen, wird wieder 2 x gewaschen ( 1xPBS/0,3% BSA/0,1% Triton X-100). Danach erfolgt die Inkubation mit dem Avidin/Biotin-Peroxidase-Komplex (Vectastain Elite ABC Kit, Vector Laboratories) für eine Stunde. Die Formation des Avidin/Biotin/Peroxidase-Komplex benötigt zuvor etwa eine halbe Stunde bei Raumtemperatur.

Nach der Inkubation mit dem Peroxidase-Komplex werden die Gewebeschnitte 1x mit 1x PBS/0,3% BSA/0,1% Triton X-1000 und 2x kurz 1x PBS gewaschen. Anschließend werden die Schnitte mit der Substrat-Lösung (DAB, Vector Laboratories) überschichtet und für bis zu 10 Minuten entwickelt. Bevor die Schnitte mit Kaisers-Glycerin-Gelatine eingedeckelt werden, wird die Farbreaktion durch 3 x Waschen mit PBS gestoppt.

## 4. Abkürzungen und Definitionen

### 4.1 Abkürzungen

aa	Aminosäure
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
Amp	Ampizillin
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ATc	Anhydrotetrazyklin
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	Bakterielles Artifizielles Chromosom
Bis-AA	Bisacrylamid (N,N'-Methylen-Bisacrylamid)
<i>bla</i>	Gen für das Enzym $\beta$ -Lactamase (vermittelt Ampicillin-Resistenz)
$\beta$ -Gal	$\beta$ -Galaktosidase
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
ccc	ringförmig geschlossene Plasmid-DNA („covalent closed circular“)
CIP	alkalische Phosphatase („calf intestinal phosphatase“)
CTP	Cytosintriphosphat
ddXTP	2'-3'-Dideoxyribonukleotide
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure („desoxyribonucleic acid“)
DNase	Desoxyribonuklease
Dox	Doxyzyklin
dsDNA	doppelsträngige („double stranded“) DNA
DTT	Dithiothreitol
dXTP	2'-Desoxyribonukleotide
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Etanol
GTP	Guanosintriphosphat
hCMV	humaner Cytomegalo Virus
hGH	„human Growth hormone“ (humanes Wachstums-Hormon)
bGH	„bovine Growth hormone“ (Rinder-Wachstums-Hormon)
HMW	„high molecular weight“ (hohes Molekulargewicht)
HSB	Hoch-Salz Puffer („High salt buffer“)
HTH	$\alpha$ -Helix-Turn- $\alpha$ -Helix-Motiv
Hyg	Hygromyzin
IgG	Immunglobulin G
<i>i.p.</i>	intraperitoneal
Kb	Kilo-Basenpaare (1Kb entspricht 1000Bp)
<i>lacI</i>	Gen für Repressor des Laktose-Operons aus <i>E. coli</i>
<i>lacO</i>	Operator in der Kontrollregion des Laktose-Operons von <i>E. coli</i>
<i>lacZ</i>	Gen für das Enzym $\beta$ -Galaktosidase aus <i>E. coli</i>
LB	"Luria Broth" (Nährmedium)
<i>luc</i>	Gen für das Enzym Luziferase des Leuchtkäfers <i>Photinus pyralis</i>
MAR	„matrix attachment region“
MCS	„multiple cloning site“
mind.	mindestens

---

<i>neo</i>	Gen für das Enzym Neomycin-Phosphotransferase (vermittelt Resistenz gegen G418)
nt	Nucleotide
NTP	Nukleosidtriphosphat
O	Operator
OD	optische Dichte
ONPG	ortho-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosidsid
ori	„origin of replication“ (Replikations-Ursprung)
<sup>32</sup> P	Phosphorisotop der relativen Masse 32
P	Promotor
p	Plasmid
PAA	Polyacrylamid
PAGE	PAA-Gelelektrophorese
PBS	„phosphate buffered saline“
PEV	Position Effekt Variegation
PFGE	„pulsed field gel electrophoresis“ (gepulste Gel-Elektrophorese)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoff-Ionenkonzentration
PNK	Polynukleotidkinase
Poly(A)	Polyadenylierungssignal
pUH	Plasmid Universität Heidelberg
R	Repressor
RNA	Ribonukleinsäure ("ribonucleic acid")
RNA Pol	RNA-Polymerase
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
rtTA	reverser Tetrazyklin-kontrollierbarer Transaktivator
SDS	Natriumdodecylsulfat ("sodium dodecyl sulfate")
S/MAR	„scaffold/matrix attachment region“
ssDNA	einzelsträngige („single stranded“) DNA
SV40	„ <i>Simian</i> “ Virus 40
T	Thymin
TA	Tris-Acetat
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
Tc	Tetrazyklin
Tc-HCl	Tetrazyklin-Hydrochlorid
TE	Tris-EDTA
Tn	Transposon
<i>tetO</i>	Operator des Kontrollregion des <i>Tn10</i> Resistenzoperons aus <i>E. coli</i>
<i>tetR</i>	Gen des Repressors des <i>Tn10</i> Resistenzoperons aus <i>E. coli</i>
TetR	Repressor des <i>Tn10</i> Resistenzoperons aus <i>E. coli</i>
TEMED	N,N,N',N'-Triethylmethyl-ethyl-diamin
tet/Tet	Tetrazyklin
Tris	Tris-Hydroxymethylaminomethan
tTA	Tetrazyklin-kontrollierbarer Transaktivator
tRNA	„transfer“ RNA
TTP	Thymintriphosphat
U	Uracil
ÜN	über Nacht
ÜNK	Über-Nacht-Kultur
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
<i>wt</i>	Wildtyp
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosidsid
YAC	„Yeast artificial chromosome“ (artifizielles Hefe- Chromosom)

## 4.2 Einheiten

Å	Ångström ( $10^{-10}\text{m}$ )
A	Ampere
Bp	Basenpaar(e)
Ci	Curie
Cm	Zentimeter
cpm	Zählpulse pro Minute („counts per minute“)
Da	Dalton
g	Gramm / Erdanziehungskraft
h	Stunde(N) (lat. "hora")
l	Liter
m	Milli
μ	Mikro
M	molar, (mol/l)
min	Minute(n)
mm	Millimeter
Mol	ca. $6,023 \times 10^{23}$ Moleküle
Ω	Ohm
rlu	Relative Lichteinheiten („relative light units“)
rpm	Umdrehungen pro Minute
sec	Sekunde(n)
U	Einheit der Enzymaktivität („Unit“)
V	Volt

## 4.3 Vorsätze

k	kilo	$10^3$
m	milli	$10^{-3}$
μ	mikro	$10^{-6}$
n	nano	$10^{-9}$
p	piko	$10^{-12}$
f	femto	$10^{-15}$

## 4.4 Nukleotide

A	Adenosin
C	Cytosin
G	Guanosin
T	Thymin

## 4.5 Definitionen

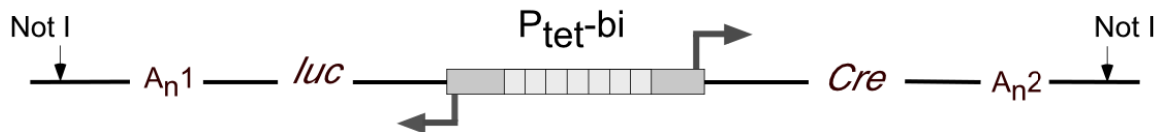
In dieser Arbeit wurden zum Teil englische Fachausdrücke beibehalten, da entweder keine sinnvolle, oder nur eine umständliche Übersetzung ins Deutsche möglich ist.

'blunt end':	glattes Ende eines DNA-Moleküles, d. h. keine 3'- oder 5'- überhängenden Basen
'Boundary':	alternativer Begriff für Isolator
'Enhancer':	Regulatorisches DNA-Element, welches auf einem DNA-Molekül, orientierungs- und positionsunabhängig die Transkriptionsinitiation einiger eukaryotischer Promotoren aktiviert.
'Knock out':	Transgenes Tier mit einer Gendeletion
'Knock in':	Transgenes Tier mit einer Gensubstitution
'Maxiprep':	Schnellmethode zur Plasmid-DNA-Isolierung und-Aufreinigung aus <i>E. coli</i> mit hoher DNA-Ausbeute.
'Miniprep':	Schnellmethode zur Plasmid-DNA-Isolierung und -Aufreinigung aus <i>E. coli</i> mit geringer DNA-Ausbeute.
'multiple cloning site':	DNA-Region, die die Erkennungssequenzen für mehrere Restriktionsendonukleasen umfasst.
'Pellet':	Sediment.
'Position Effect Variegation (PEV):	Chromosomaler Einfluss auf die Expression eines Transgens, kann zu einer zufälligen Gen-Inaktivierung führen
'Primer':	ssDNA- oder RNA-Oligonukleotid, das nach Paarung mit einer DNA-Matrize als Substrat für eine enzymatische DNA-Synthese dient.
'Scaffold/Matrix Attachment Region':	DNA-Sequenzen, die eine Bindung an das nukleäre Proteingerüst vermitteln
'sticky end':	3'- oder 5'-überhängendes DNA-Ende.
'supercoil':	topologische Zustandsbeschreibung von ringförmig geschlossener DNA in Abhängigkeit ihrer Verwindungszahl.
'template':	Matrize

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Charakterisierung der LC-1 Linie

Im ersten Teil meiner Doktorarbeit beschäftigte ich mich mit der detaillierten Charakterisierung der LC-1-Linie. Diese Linie trägt das Gen der Luziferase sowie der Cre-Rekombinase, die unter der Kontrolle von  $P_{tet-bi}$  (Abb. 3) stehen. Das 6,8 Kb-Konstrukt, welches bei der Mikroinjektion in befruchtete Eizellen zur Herstellung der LC-1-Linie verwendet wurde, ist in Abb. 5 dargestellt.



**Abb. 5: Topographie des zur Herstellung der LC-1 Linie benutzten DNA-Fragments**

Der bidirektionale Promotor ( $P_{tet-bi}$ ), der die Transkription des Luziferase- (*luc*) sowie des *cre*-Gens kontrolliert, besteht aus sieben zentralen *tet*-Operatorsequenzen (hellgraue Quadrate) sowie zwei flankierenden Minimalpromotoren.  $A_n1$ , Polyadenylierungssignal aus SV40 Virus;  $A_n2$ , Polyadenylierungssignal des humanen Wachstumshormons; NotI, Endonukleaseschnittstelle.

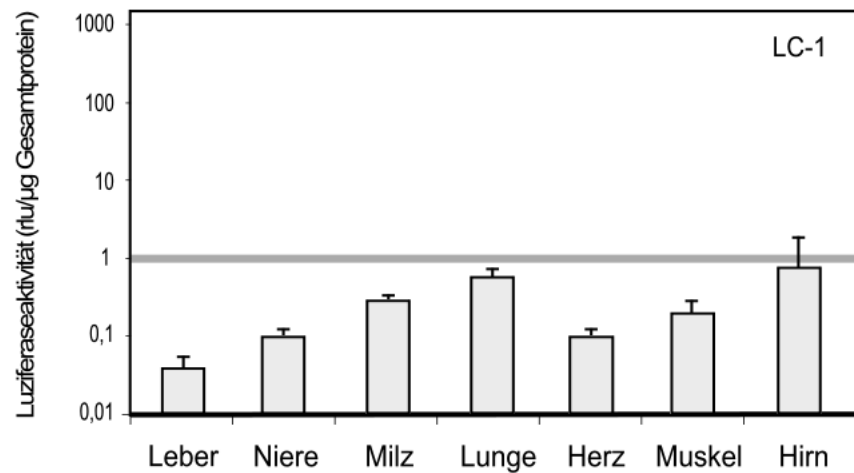
Einzelheiten zum Konstrukt, zur Etablierung entsprechender Mauslinien und eine erste Charakterisierung der verschiedenen Stammtiere sind in der Doktorarbeit von Frieder Schwenk zu finden (F. Schwenk, Dissertation Universität Köln, 1997). Die LC-1-Linie wurde in diesen Experimenten aus sieben Gründerlinien ausgewählt, da sie die besten Regulationseigenschaften hatte.

#### 5.1.1 Bestimmung der basalen Luziferase Aktivität in der LC-1-Linie

Zur quantitativen Analyse der Genregulation wird in dieser Arbeit vor allem das Reportergen Luziferase eingesetzt. Wie von Andreas Kistner in unserem Labor gezeigt wurde, ist die Messung von Luziferase ein verlässliches Prinzip zur Analyse von Genaktivitäten in verschiedenen Geweben in der Maus, in deren Extrakten die Aktivität des Enzyms über bis zu sechs Größenordnungen linear bestimmt werden kann.

Um die nicht-kontrollierbare Aktivität des  $P_{tet-bi}$  in der LC-1-Linie abzuschätzen, wurde die Luziferaseaktivität in sieben Organen von LC-1-Individuen, wie bei Kistner *et al.* (1996) beschrieben, bestimmt (Abb. 6)





**Abb. 6: Luziferaseaktivität in Organextrakten der Linien LC-1**

Tiere der Linie LC-1 ( $n=7$ ) wurden getötet, die Organe entnommen und Gewebeextrakte hergestellt. Anschließend wurde die Luziferaseaktivität in 10  $\mu$ l Extrakt gemessen und die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt. Die Luziferasewerte sind entsprechend auf rlu/ $\mu$ g Gesamtprotein normiert. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung der Einzelwerte. In Gewebeextrakten von wt-Mäusen werden Luziferase-Werte bis zu 1 rlu/ $\mu$ g gemessen. Diese maximale wt-Basalaktivität ist als graue Linie in der Abbildung dargestellt.

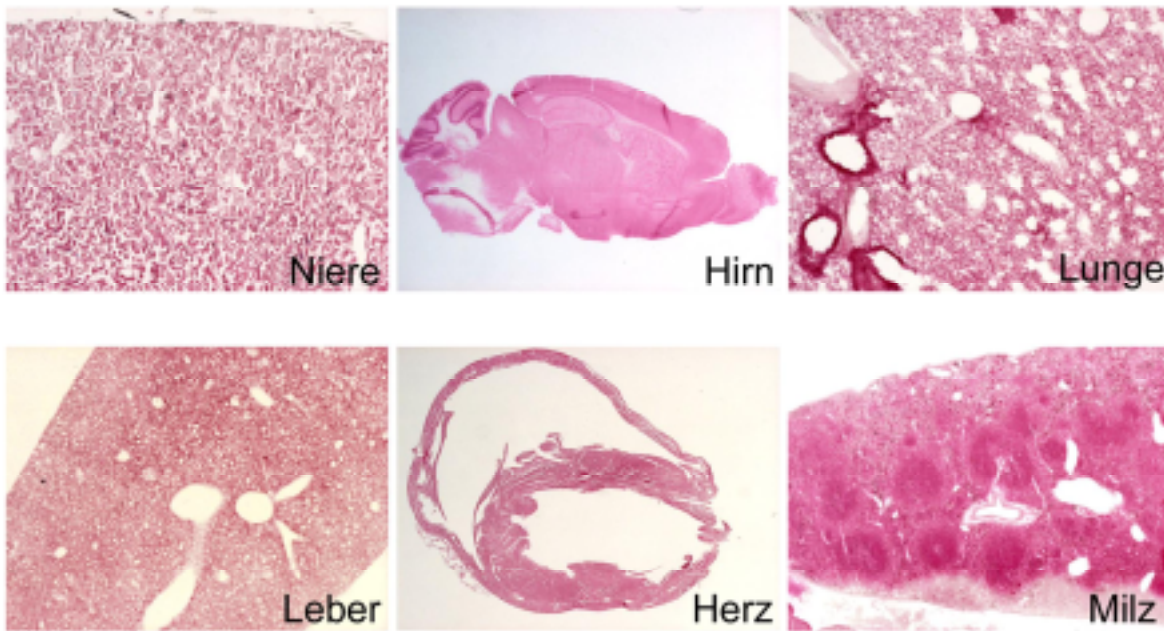
In allen untersuchten Organen wurden durchschnittliche Enzymaktivitäten unter 1 rlu/ $\mu$ g Gesamtprotein gemessen. Diese Werte entsprechen der Aktivität der Gewebeextrakte von wt-Mäusen, die bis zu 1 rlu/ $\mu$ g betragen kann (Daten nicht gezeigt).

Durch die Expression des Reportergens Luziferase sollte auch die Ausprägung der Cre-Rekombinase indirekt messbar sein. Da die Aktivität der Luziferase in LC-1-Tieren sehr niedrig ist, sollte auch keine signifikante Expression des *cre*-Gens vorliegen. Eine Korregulation der beiden Gene kann aber nicht mit Sicherheit vorausgesagt werden, weshalb LC-1-Mäuse auf eine unregulierte Ausprägung der Rekombinase hin untersucht werden müssen.

### 5.1.2 Untersuchung der basalen Aktivität der Cre Rekombinase in der LC-1-Linie

Um die Cre-Funktion in LC-1 Mäusen zu überprüfen, wurde der Mausstamm *R26R* verwendet, in dem ein Rekombinationssubstrat der Cre-Rekombinase genomisch integriert ist (siehe Einleitung). Da hier nur die basale Aktivität der LC-1 Linie getestet werden soll, sind in diesem Experiment nur doppelt transgene Mäuse (LC-1/*R26R*) notwendig. Nach erfolgter Rekombination ist der *R26R*-Locus irreversibel verändert und die Cre-vermittelte Rekombination kann z.B. durch histologische Schnitte *in situ* durch eine X-Gal Farbreaktion (Hogan *et al.*, 1994) sichtbar gemacht werden. Um auch eine geringe Cre-Aktivität

nachzuweisen, wurden Mäuse sowohl am Tag E14 vor der Geburt (Daten nicht gezeigt) als auch nach 14 Monaten analysiert (Abb. 7).



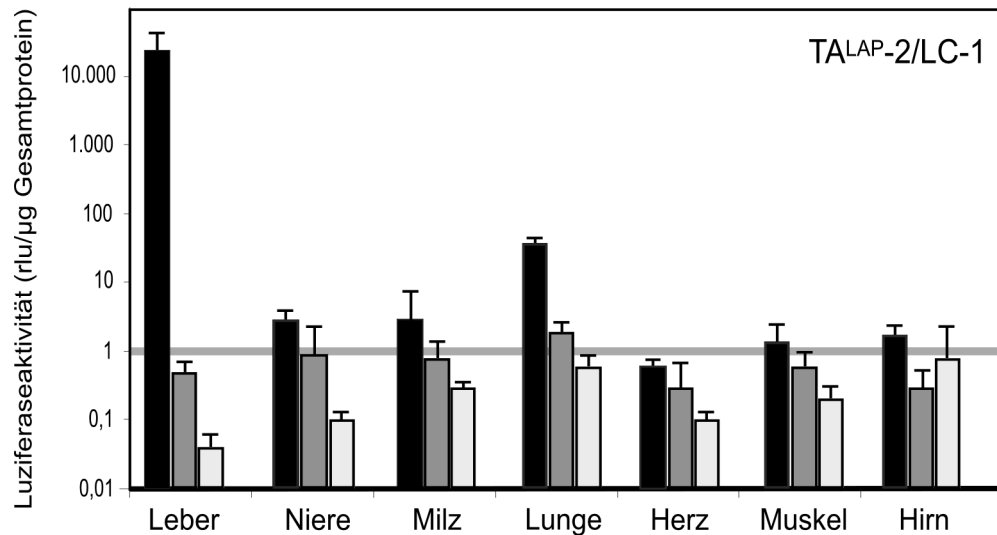
**Abb. 7: *In situ*-Analyse der Rekombinase-vermittelten *lacZ*-Expression in Organen von doppelt transgenen LC-1/R26R Mäusen**

Die Organe von 14 Monate alten doppelt transgenen LC-1/R26R Tieren wurden durch Perfusion mit 4% Paraformaldehyd fixiert, geschnitten mit X-Gal über Nacht inkubiert und mit Kernechtrot gegengefärbt. Die Dicke der Präparate ist 15-20µm.

Weder in den Embryos noch in adulten bis zu 14 Monate alten Mäusen konnte eine Blaufärbung der Gewebeschnitte entdeckt werden. Dies bedeutet, dass der  $P_{tet}$ -bi in dieser Linie in praktisch allen Zelltypen und auch während der gesamten Entwicklung des Tieres so inaktiv ist, dass keine signifikante Cre-Aktivität festgestellt werden kann. Nur in wenigen Individuen waren vereinzelt Zellen in der Niere und im Herz angefärbt.

### **5.1.3 Bestimmung der Luziferase-Aktivität in $TA^{LAP}$ -2/LC-1 Tieren in Abhängigkeit von Doxzyklin**

Zur Analyse der Transaktivator-vermittelten Induktion des Luziferasegens wurde die LC-1-Linie mit Mäusen verpaart, die tTA unter der Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors ausprägen. Diese Linie,  $TA^{LAP}$ -2 (Kistner *et al.*, 1996) wurde ausgewählt, da sie eine spezifische und sehr gut charakterisierte Aktivierung von  $P_{tet}$ -bi in der Leber vermittelt. Doppelt transgene Tiere wurden zwei Wochen unter Dox (2mg/ml im Trinkwasser) gehalten, bevor die Luziferaseaktivität in Organextrakten bestimmt wurde (Abb. 8).



**Abb. 8: Luciferaseaktivität in Organextrakten von TA<sup>LAP</sup>-2/LC-1 Tieren**

Vier doppelt transgene TA<sup>LAP</sup>-2/LC-1 Tiere wurden für zwei Wochen mit 2mg/ml Dox im Trinkwasser gehalten, eine weitere Gruppe von vier Mäusen bekam Dox-freies Trinkwasser. Die Luziferasewerte der Organextrakte wurden auf rlu/μg Gesamtprotein normiert. Als Vergleich sind die durchschnittlichen Werte der LC-1 Linie angegeben (helle Balken, n=7). Schwarze Balken: - Dox (n = 4); graue Balken: + Dox (n =4).

In Abwesenheit von Doxyzyklin, d.h. im angeschalteten Zustand, wurde in doppelt transgenen Tieren in der Leber hohe Luziferasewerte (ca. 24.000 rlu/μg) gemessen. Im abgeschalteten Zustand bewegen sich die Luziferaseaktivitäten im Bereich von 0,5 bis 2 rlu/μg Gesamtprotein. In der Leber ist so eine Regulation über vier Größenordnungen (-Dox/+Dox) möglich. Die Spezifität der Leberexpression ist im Vergleich zu anderen Organen sehr gut ausgeprägt, sie schwankt zwischen 650fach (im Vergleich zur Lunge) und 10.000fach (restliche gemessene Organe).

## 5.2 Mauslinien zur leberspezifischen Expression des *rtTA2<sup>S</sup>S2*-Gens

### 5.2.1 Herstellung der rTA<sup>LAP</sup>-1 Linie

Zur Herstellung der rTA-Mauslinie sollte zur Transkriptionskontrolle das 2,8 Kb große LAP- („Liver enriched Activator Protein“) Promotor/Enhancer-Fragment (P<sub>LAP</sub>) benutzt werden. Dieses Fragment vermittelte in Versuchen von Talbot *et al.* (1994) in 23 von 24 Mauslinien eine Transgen-Expression in vielen Geweben der Maus, vor allem aber in der Leber. In diesen Mäusen wurde die neue rTA<sup>S</sup>-S2-Variante des reversen Transaktivators (Urlinger *et al.*, 2000) eingesetzt, die im Vergleich zum ursprünglich beschriebenen rTA keine intrinsische basale Aktivität zeigt und in Hela-Zellen eine höhere Stabilität aufweist. Dazu wurde das Expressionsplasmid pUHT61-30 konstruiert, in dem das *rtTA2<sup>S</sup>-S2*-Gen von P<sub>LAP</sub> kontrolliert

wird. Als Ausgangsplasmid wurde das Konstrukt pUhrT61-1 verwendet (Urlinger *et al.*, 2000), hier steht das *rtTA2<sup>S</sup>-S2*-Gen unter der Kontrolle der Promotor/Enhancer-Region des menschlichen Cytomegalovirus ( $P_{hCMV}$ ). In diesem Plasmid wurde zunächst das SV40-PolyA-Signal durch ein  $\beta$ -Globin-PolyA-Signal ausgetauscht, was zu dem Plasmid pUhrT61-1 führte. In einem weiteren Schritt wurde  $P_{hCMV}$  mit der 2,8 Kb langen  $P_{LAP}$ -Sequenz ersetzt. Die Funktionalität des resultierenden Plasmids pUhrT61-30 (Plasmid-Karte und Sequenz siehe Anhang) konnte durch transiente Transfektion in HuH („human hepatoma cell line“-) Zellen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Zur Herstellung der transgenen Mäuse wurde das 5.5 Kb große XmnI/AseI-Fragment aus pUhrT61-30 (Abb. 9) in befruchtete Eizellen mit C57Bl/6xDBA-Hintergrund injiziert und diese wieder reimplantiert.



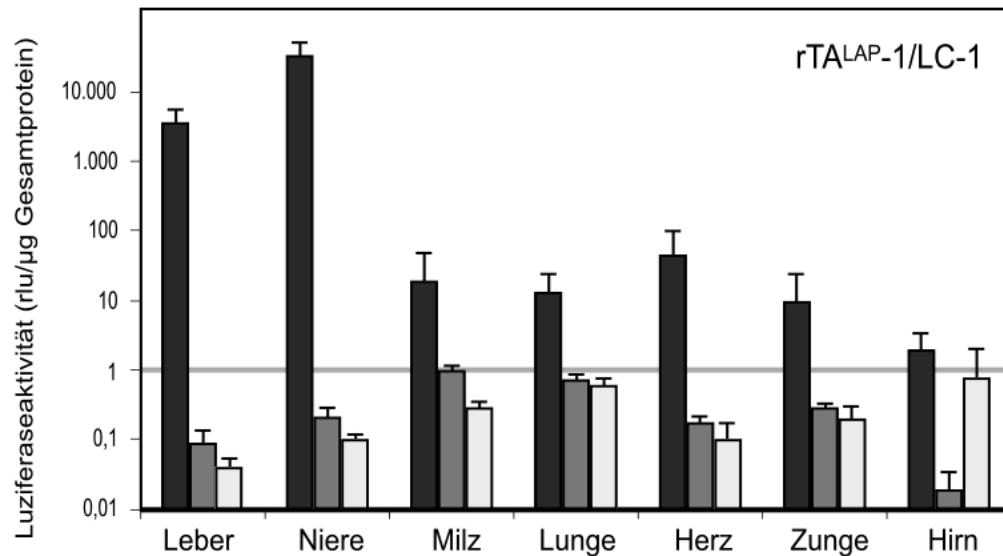
**Abb. 9: Das zur Herstellung der  $rTA^{LAP}$ -Mäuse benutzte DNA-Fragment aus pUhrT61-30**

$P_{LAP}$ , 5'-regulatorische Region des LAP-Gens der Ratte; *rtTA2<sup>S</sup>-S2*, codierende Sequenz des *rtTA2<sup>S</sup>-S2*-Gens;  $A_n$ , Kaninchen  $\beta$ -Globin-Polyadenylierungssignal mit Intron; XmnI, AseI, Restriktionsschnittstellen.

Durch PCR und „Southern-Blot“-Analyse wurden sieben Stammtiere identifiziert, welche das gewünschte DNA-Konstrukt integriert enthielten. Sie wurden mit  $rTA^{LAP}$ -1 bis 7 gekennzeichnet.

### 5.2.2 Quantifizierung der Luziferaseexpression in adulten $rTA^{LAP}$ -1/LC-1 Tieren

Die sieben  $rTA^{LAP}$ -Stammtiere wurden mit LC-1-Mäusen verpaart, um eine funktionale Expression des *rtTA2<sup>S</sup>-S2*-Gens durch die Aktivierung des Luziferase-Reporters nachzuweisen. Zwei der DNA-positiven Tiere gaben ihr Transgen in diesen Kreuzungen nicht an ihre F1-Nachkommen weiter. Doppelt transgene Mäusen der fünf verbleibenden Linien wurden für eine Woche mit 2 mg/ml Dox im Trinkwasser induziert und anschließend *in vivo* auf Luziferase-Aktivität untersucht (siehe Abschnitt 5.2.5). Nur Tiere der Linie  $rTA^{LAP}$ -1 waren in der Lage, das LC-1 Transgen zu aktivieren. Zur quantitativen Analyse dieser Linie wurden doppelt transgene  $rTA^{LAP}$ -1/LC-1-Mäuse für zwei Wochen unter 2mg/ml Dox im Trinkwasser gehalten, bevor in sieben Organenextrakten die Luziferase-Aktivität gemessen wurde. Als Kontrolle dienten nicht-induzierte Tiere (Abb. 10).



**Abb. 10: Luziferaseaktivität in Organextrakten von rTA<sup>LAP</sup>-1/LC-1 Tieren**

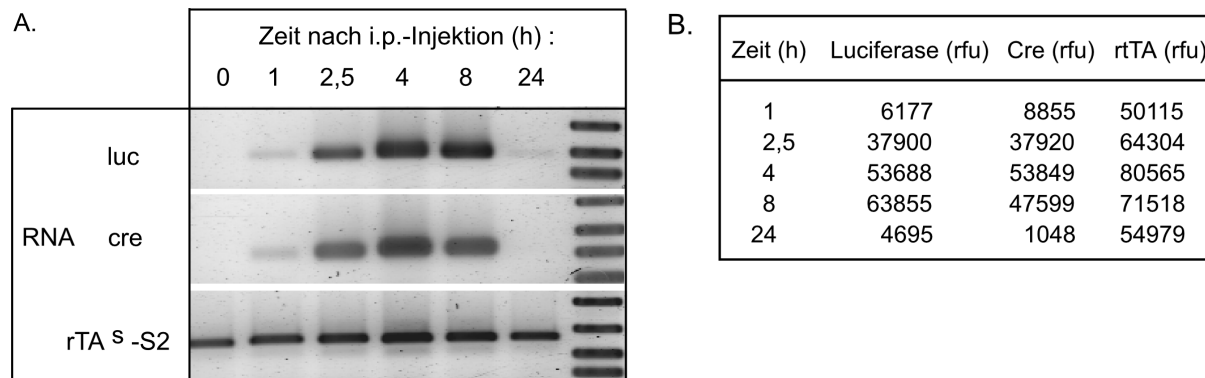
Doppelt transgene TA<sup>LAP</sup>-2/LC-1 Tiere wurden für zwei Wochen mit 2mg/ml Dox bzw. mit Dox-freiem Trinkwasser gehalten. Die Luziferasewerte der Organextrakte wurden auf rlu/μg Gesamtprotein normiert. Als Vergleich sind die durchschnittlichen Werte der LC-1 Linie angegeben (helle Balken, n=7). Schwarze Balken: + Dox (n= 6); graue Balken: - Dox (n=3).

Vergleicht man zunächst die Werte der doppelt transgenen Tiere im abgeschalteten Zustand (-Dox) mit den Werten der LC-1 Linie, sind kaum Unterschiede zu erkennen. Die Anwesenheit des Transaktivators hat also keinen signifikanten Einfluss auf die basale Enzymaktivität in diesen Tieren. Nach Induktion des Systems durch Dox im Trinkwasser ist eine Steigerung der Luziferase-Expression in allen gemessenen Organen sichtbar. Die höchsten Werte wurden in der Niere (30.000 rlu/μg Protein) und Leber (ca. 4000 rlu/μg) der rTA<sup>LAP</sup>-1/LC-1 Mäuse gemessen. Die anderen Organe liegen im Vergleich zur Leber etwa 100- bis 1000fach niedriger. Die unterschiedlich starke Luziferase-Induktion in den verschiedenen Geweben ist auf die entsprechende Aktivität des LAP-Promotors in der rTA<sup>LAP</sup>-1 Linie zurückzuführen. Wie schon durch Andreas Kistner gezeigt wurde, unterliegt das LAP-Promotorfragment Positionseffekten (Kistner, Dissertation Universität Heidelberg, 1996)

#### 5.2.2.1 Analyse der Koexpression von Luziferase und Cre auf mRNA-Ebene

Um zu überprüfen, ob die beiden Gene der LC-1 Transkriptionseinheit streng korreguliert sind, wurde die Induktion der Gene auf mRNA-Ebene verfolgt. Dazu wurden in doppelt transgenen Tiere der Linien rTA<sup>LAP</sup>-1 und LC-1 die Genexpression mit einer einmaligen *i.p.*-Injektion von 2mg Dox induziert. Die Menge der mRNA wurde zu verschiedenen Zeitpunkten (0 - 1- 2,5 - 4 - 8 und 24 Stunden nach Injektion) gemessen. Dazu wurde das Produkt einer RT-PCR in einem Agarose-Gel aufgetrennt und anschließend die Intensität der DNA-Banden

bestimmt (Abb. 11). Die Stärke der Banden im Gel wurde als rfu („relative fluorescence unit“) bestimmt, die Werte sind auf die Expression des *rTA2s-S2*-Gens normiert.



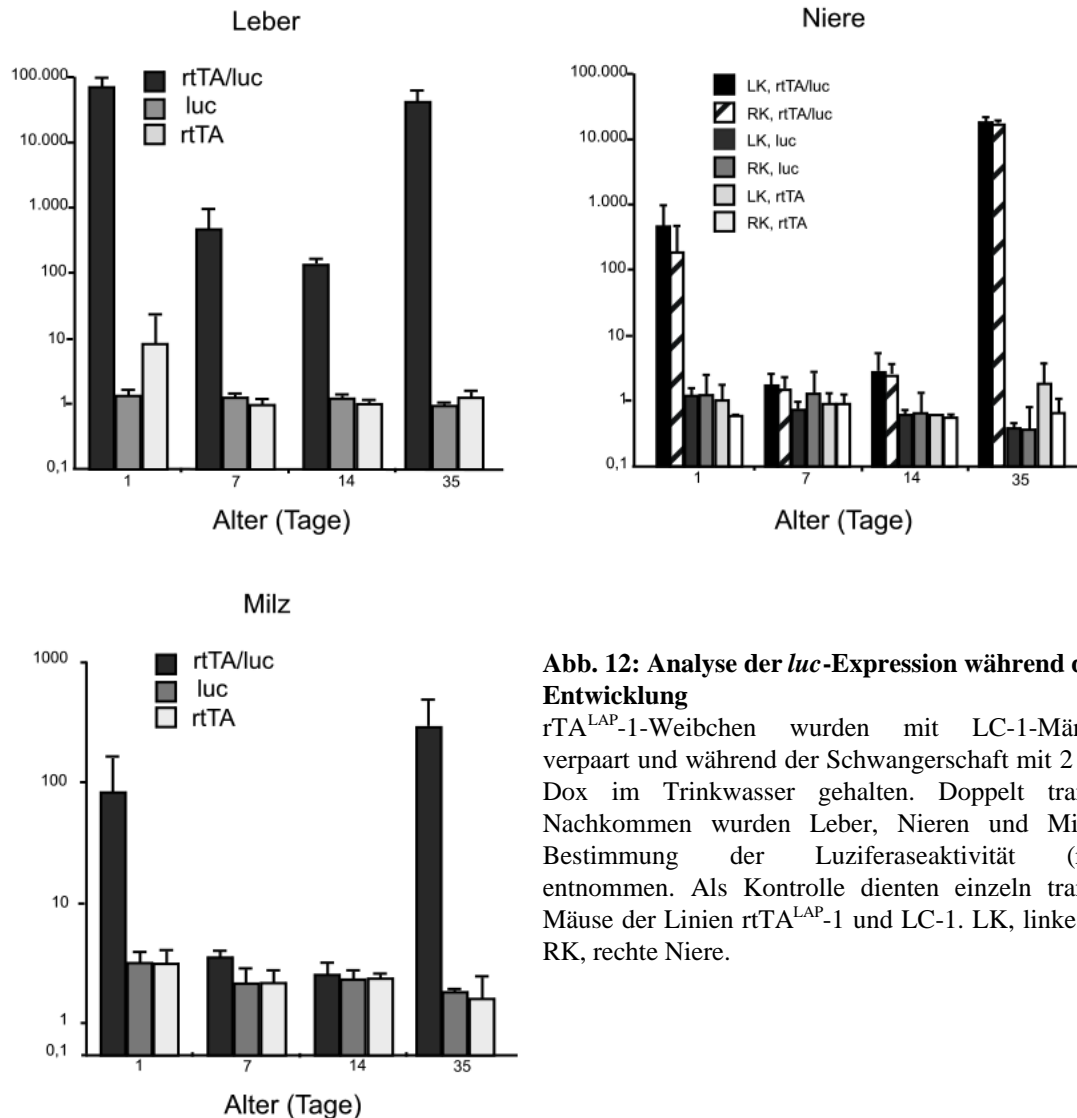
**Abb. 11: mRNA-Nachweis von Luziferase und Cre nach i.p.-Injektion**

Die Expression des *luc*- und *cre*-Gens wurde in rTA<sup>LAP</sup>-1/LC-1-Tieren durch eine einmalige Injektion von 2mg Dox induziert. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurde die Leber-mRNA präpariert und in einer RT-PCR eingesetzt. Das Produkt der Amplifikation wurde in einem 1%igem Agarosegel aufgetrennt (A) und durch Fluoreszenz quantifiziert (B). Zur Normalisierung wurde die Menge der rTA-S2-mRNA in den Proben bestimmt. rfu: „relative fluorescence unit“.

Wie erwartet, wird die Transkription des *rTA<sup>S</sup>-S2*-Gens unter der Kontrolle von P<sub>LAP</sub> von Doxyzyklin nicht beeinflusst. Sowohl in der Leber Doxyzyklin-behandelter als auch unbehandelter rTA<sup>LAP</sup>-1/LC-1 Mäuse sind etwa gleiche Mengen der rTA-mRNA innerhalb des Organs vorhanden. Die *luc* und *cre*-Ergebnisse zeigen, dass eine parallele Induktion der beiden mRNAs erfolgt. Während in Abwesenheit von Doxyzyklin durch die RT-PCR kein Transkript nachgewiesen werden kann, ist eine Stunde nach Injektion bereits ein Signal zu erkennen. Nach 1,5 Stunden sind beide Gene stark induziert, in dieser Zeit wird die Menge der beiden mRNAs um das Sechsfache (*luc*) bzw. das Vierfache (*cre*) erhöht. Maximale mRNA-Konzentrationen werden zwischen 4 h und 8 h nach der Dox-Injektion gefunden, nach 24h ist die Transkription praktisch beendet.

### 5.2.3 Induktion des *luc*-Gens in rTA<sup>LAP</sup>-1/LC-1-Tieren während der Entwicklung

In weiteren Experimenten sollte nun untersucht werden, ob eine quantitative Regulation der Luziferase auch während der Entwicklung bzw. in jungen Mäusen möglich ist. Für dieses Experiment wurden rTA<sup>LAP</sup>-1 transgene Weibchen eine Woche vor der Verpaarung mit LC-1-Männchen mit 2mg/ml Dox im Trinkwasser gehalten. Die Nachkommen aus den Verpaarungen wurden am Tag der Geburt bzw. 7, 14 und 35 Tage danach auf Luziferaseaktivität in Leber, Niere und Milz hin untersucht (Abb. 12).



**Abb. 12: Analyse der *luc*-Expression während der Entwicklung**

rTA<sup>LAP</sup>-1-Weibchen wurden mit LC-1-Männchen verpaart und während der Schwangerschaft mit 2 mg/ml Dox im Trinkwasser gehalten. Doppelt transgene Nachkommen wurden Leber, Nieren und Milz zur Bestimmung der Luziferaseaktivität (rlu/μg) entnommen. Als Kontrolle dienten einzeln transgene Mäuse der Linien rtTA<sup>LAP</sup>-1 und LC-1. LK, linke Niere; RK, rechte Niere.

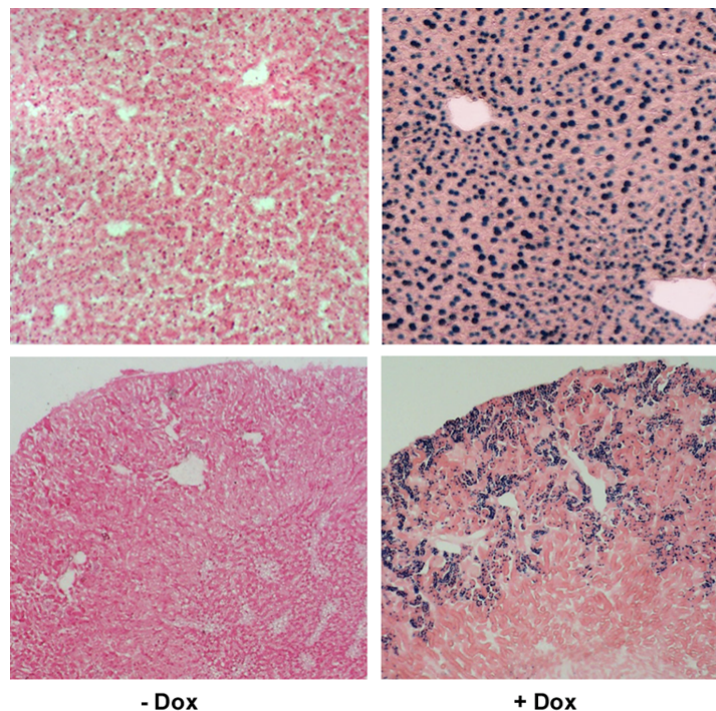
Schon in den neugeborenen Mäusen kann eine Luziferase-Induktion in den analysierten Organen festgestellt werden. Die Aktivität zu diesem Zeitpunkt entspricht in der Leber und der Milz etwa der Aktivität 35 Tage nach der Geburt, in der Niere ist die Expression Tag 1 postpartum mehr als 10fach niedriger als fünf Wochen danach. Eine bzw. zwei Wochen nach Geburt wird in allen Organen eine deutliche Reduktion der Enzymaktivität gemessen, in der Milz und der Niere sind hier nur Basalaktivitäten vorhanden (ca. 1 rlu/μg), die identisch mit den Werten von einzeln transgenen LC-1 oder rTA<sup>LAP</sup>-1-Tieren sind. In der Leber findet in dieser Zeit noch eine gewisse Expression des *luc*-Gens statt, die Aktivität entspricht aber weniger als 1% der Expression am Tag 35. Aus diesen Daten lässt sich schließen, dass über die Muttermilch nicht genügend Mengen an Dox übertragen werden kann um rtTA2<sup>S</sup>-S2 ausreichend zu aktivieren. Erst wenn die Jungtiere sich mit Trinkwasser versorgen, wird die erwartete Luziferaseaktivität festgestellt.



### 5.2.3.1 *In situ*-Analyse der rtTA-vermittelten lacZ-Expression in rTA<sup>LAP</sup>-1/nZL-2-Tieren

Die Messung der Luziferase-Expression ermöglicht einen quantitativen Einblick in das Regulationspotential des Tet-Systems in doppelt transgenen Mäusen. Über die genaue Lokalisierung der transkriptionellen Aktivität sagt sie nichts aus, da hier nur grob zwischen den verschiedenen Geweben unterschieden werden kann. In den meisten Organen gibt es eine Vielzahl von Zelltypen, die mehr oder weniger zur Expression beitragen können. Um die rTA<sup>2s-S2</sup>-Expression mit zellulärer Auflösung nachzuweisen, wurden rTA<sup>LAP</sup>-1-Tiere mit nZL-2-Mäusen verpaart. Die nZL-2-Linie wurde von Andreas Kistner in unserem Labor hergestellt, sie trägt das *lacZ*- sowie das *luc*-Gen unter Kontrolle von P<sub>tet</sub>-bi. Zur Verbesserung der zellulären Auflösung bei histologischen Untersuchungen wurde hier eine  $\beta$ -Galaktosidase mit einer N-terminalen Fusion der SV40 „large“-T-Antigen-Kernlokalisierungssequenz verwendet. In vorhergehenden Analysen (Schönig & Bujard, 2002) wurde der nZL-2-Mausstamm als Reporterlinie ohne PEV charakterisiert.

Doppelt transgene rTA<sup>LAP</sup>-1/nZL-2-Tiere wurden für zwei Wochen mit 2 mg/ml Dox bzw. mit Dox-freiem Trinkwasser gehalten, bevor man die *lacZ*-Expression *in situ* in Gewebeschnitten der Leber und der Niere überprüfte (Abb. 13).



**Abb. 13: *In situ*-Analyse der rtTA-vermittelten lacZ-Expression in der Leber und Niere von doppelt transgenen rTA<sup>LAP</sup>-1/nZL-2 Mäusen**

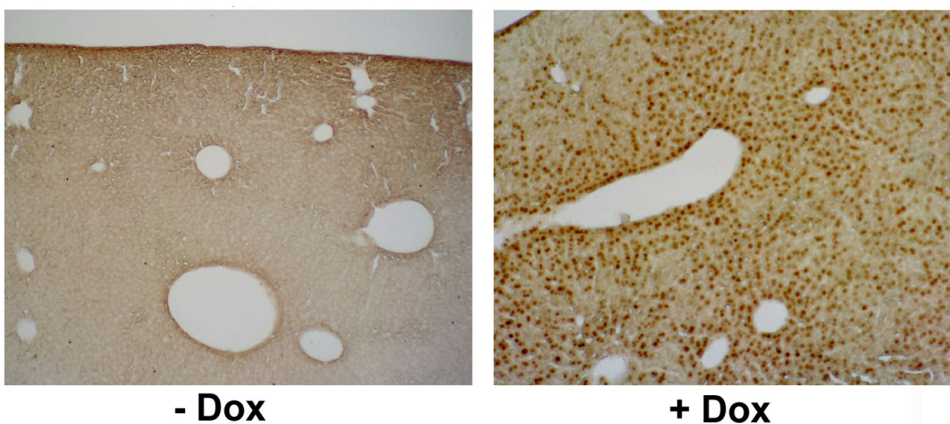
Die Mäuse wurden eine Woche mit bzw. ohne 2mg/ml Doxzyklin getränkt. Nach Tötung der Mäuse wurden Leber (oben) und Niere (unten) geschnitten, fixiert und mit X-Gal-Färbelösung überschichtet. Die 15-20 $\mu$ m dicken Schnitte wurden bis zur Blaufärbung inkubiert und anschließend mit Kernechtrot gegengefärbt.



Wie in den Leberschnitten zu sehen ist, findet nur in Hepatozyten eine Aktivierung des *lacZ*-Gens statt, die Zellen der Gefäßwände und des Bindegewebes bleiben ungefärbt (Prof. Gebhard, pers. Mitteilung). In der Niere ist die Synthese der  $\beta$ -Galaktosidase auf wenige Zelltypen beschränkt, die sich vor allem im Nieren-Kortex befinden.  $\beta$ -Gal-Aktivität findet sich in Zellen des proximalen Tubulus und vereinzelt auch im TAL („thick ascending limb“) - Profil des inneren Streifens der Niere (Gallagher *et al.*, zur Veröffentlichung eingereicht). Die Induktion der Genexpression ist stringent reguliert, da im abgeschalteten Zustand (-Dox) keine blauen Zellen zu sehen sind.

#### 5.2.4 Lokalisation der Expression des *cre*-Gens in der Leber von $rTA^{LAP}$ -1/LC-1-Mäusen

Durch eine Analyse der Transkriptions-Induktion der bidirektionalen Expressionseinheit der LC-1-Maus konnte festgestellt werden, dass die mRNAs der beiden Gene parallel exprimiert werden (siehe Abb. 11). Die funktionale Expression und Regulation der enzymatischen Aktivität der Luziferase wurde ebenfalls demonstriert. Um diese Daten zu vervollständigen, wurde die Induktion der Cre-Rekombinase in doppelt transgenen  $rTA^{LAP}$ -1/LC-1-Tieren auch auf Protein-Ebene untersucht. Das verwendete *cre*-Gen im LC-Konstrukt trägt am 5'-Ende ein Kernlokalisierungssignal des SV40 T-Antigens. Dadurch wird die Konzentration des Proteins im Zellkern erhöht und es kann so immunologisch in Gewebeschnitten identifiziert werden. Für den Cre-Nachweis wurden doppelt transgene  $rTA^{LAP}$ -1/LC-1-Mäuse durch *i.p.*-Injektion von 2 x 2mg Dox im Abstand von 24h induziert, die Tiere der Kontrollgruppe blieben unbehandelt. Anschließend wurden Cre-Rekombinase mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers (Arbeitsgruppe G.Schütz) nachgewiesen (Abb. 14).



**Abb. 14 *In situ*-Analyse der  $rTA$ -vermittelten *cre*-Expression in der Leber von  $rTA^{LAP}$ -1/LC-1 Mäusen**

Die Mäuse wurden zweimal im Abstand von 24h mit je 2mg/ml Doxyzyklin *i.p.* injiziert. Am folgenden Tag wurden die entnommenen Lebern fixiert. In und 15-20 $\mu$ m dicken Gefrierschnitten wurde Cre-Rekombinase mit polyklonalem Antikörper nachgewiesen. Zur Anfärbung des Cre-Antikörpers wurde ein Peroxidase-gekoppelter Zweitantikörper aus der Ziege verwendet.

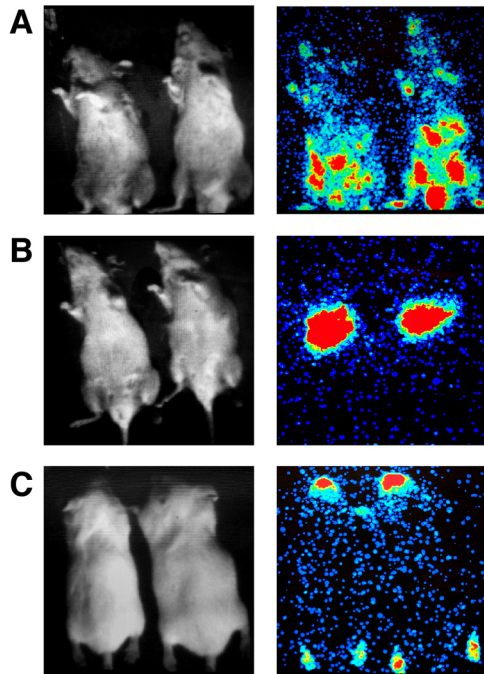
In den Leberschnitten wird das Cre-Protein durch die braune Farbreaktion des Peroxidase-gekoppelten Antikörper-Komplexes sichtbar gemacht. Nur in den Dox-behandelten Tieren ist eine Färbung im Zellkern der Hepatozyten zu sehen.

### 5.2.5 Messung der Luziferase-Reporterfunktion *in vivo*

Der Einsatz von Reportergenen wie GFP („green fluorescent protein“, Cubitt *et al.*, 1995) oder Luziferase (Gould & Subramani, 1988) ermöglicht den Nachweis von Genaktivitäten in komplexen Organismen *in vivo*. GFP kann z.B. durch einfache Bestrahlung mit UV-Licht in zellulärer Auflösung nachgewiesen werden, es ist jedoch nicht möglich, die Fluoreszenz dieses Reporters mehr als einige 100µm tief im Gewebe anzuregen. Der Einsatz des Enzyms Luziferase des Glühwürmchens (*Photinus pyralis*) ermöglicht auch die Identifikation von Genaktivitäten in inneren Organen der lebenden Maus durch Biolumineszenz (Contag *et al.*, 1997 und 1998; Sweeney *et al.*, 1999).

Durch die Kombination der Biolumineszenz-Methode zur Messung der Luziferaseaktivität mit dem Tet-System können Fragen zur Induktionskinetik oder zur Reproduzierbarkeit von An- und Abschaltvorgängen in der Maus bearbeitet werden. Die Methode hat den großen Vorteil, dass sie den mehrfachen Nachweis von Genaktivitäten im gleichen Tier ermöglicht, und so nicht für jeden Messpunkt doppelt transgene Tiere zur Analyse getötet werden müssen.

Um eine Anwendung dieses Prinzips in der Maus zu überprüfen, wurden drei verschiedene Transaktivator-Linien eingesetzt, die jeweils mit LC-1 Mäusen verpaart wurden. In den verwendeten Linien steht tTA unter der Kontrolle der Promotoren  $P_{LAP}$ ,  $P_{hCMV}$  und  $P_{CamK}$ . Doppelt transgene Mäuse, die aus diesen Verpaarungen hervorgingen, wurden betäubt, bevor man ihnen das Substrat der Luziferase, D-Luziferin, *i.p.* als wässrige Lösung injizierte (100µg/g Körpergewicht). Um die Lichtemission zu messen, wurde ein hochempfindliches Photonen-Messsystem verwendet (Hamamatsu ICCD C2400-47). Hierbei werden die betäubten und mit Luziferin versehenen Tiere in eine Dunkelkammer gelegt, in der mittels einer ccd-Kamera das freigesetzte Licht über einen „Photonen-Multiplier“ (siehe Methodenteil) als Signal verstärkt und auf einem Monitor sichtbar gemacht wird. Die Aufnahmedauer beträgt je nach Signalstärke 1-5 Minuten (Abb. 15).



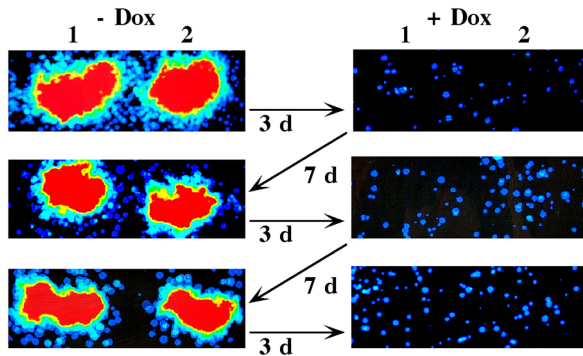
**Abb. 15 *in vivo*-Nachweis der Luziferaseaktivität**

Doppelt transgene Tiere der Linien TA<sup>hCMV</sup>-5/LC-1 (A), TA<sup>LAP</sup>-2/LC-1 (B) und TA<sup>CAMK</sup>-1/LC-1 (C) wurden betäubt und mit 100µg/g Körpergewicht D-Luziferin injiziert. Anschließend wurde die Photonenemission für 1-5 Minuten aufgenommen. P<sub>CMV</sub> ist in vielen inneren Organen aktiv, P<sub>LAP</sub> vermittelt in TA<sup>LAP</sup>-2/LC-1-Mäusen eine Genexpression nur in der Leber. In TA<sup>CAMK</sup>-1/LC-1-Tieren wird sowohl im Gehirn als auch auf Sohle der Pfoten eine Luziferase-Synthese nachgewiesen.

Die Luziferase-Aktivität ist in verschiedenen Organen von Mäusen mit hoher Sensitivität nachweisbar. In der Leber von partiell aktivierten TA<sup>LAP</sup>-2/LC-1-Mäusen konnte noch ein Signal identifiziert werden, das ca. 10 rlu/µg Gesamtprotein bei Vermessung im Lumat unter Standardbedingungen entspricht. Mäuse, die nur das LC-1-Transgen besitzen, zeigen kein Signal (Daten nicht gezeigt). Wie in Abb. 15 A. dargestellt, ist der hCMV-Promotor in TA<sup>CMV</sup>-5/LC-1-Tieren in verschiedenen inneren Organen aktiv, eine entsprechende Aktivität wurde auch schon von Kistner *et al.* (1996) in Organextrakten gemessen. Erwartungsgemäß ist in TA<sup>LAP</sup>-2/LC-1 Tieren die Biolumineszenz auf die Leber beschränkt (Abb. 15 B.). In TA<sup>CAMK</sup>-1/LC-1-Mäusen findet die Luziferase-Induktion vor allem im Gehirn statt (vgl. Mayford *et al.*, 1996), ein weiteres Signal geht von der Sohle der Mäusepfoten aus (Abb. 15 C).

#### 5.2.5.1 Kinetik der Tetrazyklin-kontrollierten Genexpression *in vivo*

Für eine Reihe von Fragestellungen ist die Kinetik, mit der in einem Tier ein Gen aktiviert bzw. inaktiviert werden kann, von Bedeutung. Daher wurde der Zeitverlauf der Luziferaseinduktion in TA<sup>LAP</sup>-2/LC-1 sowie in rTA<sup>LAP</sup>-1/LC-1-Tieren nicht-invasiv mittels Biolumineszenz verfolgt. In Vorexperimenten wurde festgestellt, dass das Tränken von TA<sup>LAP</sup>-2/LC-1 Tieren mit 2µg/ml Dox ausreicht, um die induzierte Luziferaseaktivität von durchschnittlich ca. 24.000 rlu/µg in der Leber auf das Niveau von ca. 2 rlu zu reduzieren.



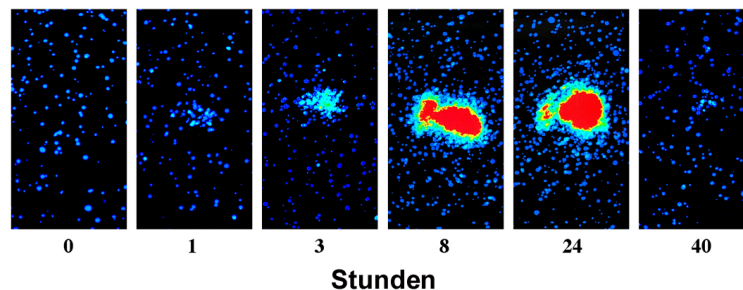
**Abb. 16: *In vivo*-Nachweis der Doxyzyklin-kontrollierten An- und Abschaltskinetik der Luziferaseaktivität in TA<sup>LAP</sup>-2/LC-1-Tieren**

Doppelt transgene Tiere der Linien TA<sup>LAP</sup>-2 und LC-1 wurden mit 2µg/ml Dox getränkt und die Luziferase-Expression *in vivo* verfolgt. Nach drei Tagen (d) ist kein Signal mehr nachweisbar. Ab diesem Zeitpunkt bekamen die Mäuse normales Trinkwasser. Bis zur Reinduktion der Genexpression dauerte es etwa sieben Tage. Wie dargestellt, kann dieser Zyklus beliebig oft wiederholt werden.

Vom induzierten Zustand ausgehend dauert es nach Dox-Gabe (2µg/ml) etwa drei Tage, bis in diesen Tieren keine Luziferaseaktivität mehr *in vivo* nachgewiesen werden kann (Abb. 16). Die Reinduktion dauert länger, hier werden sieben Tage benötigt, bis wieder eine zum Ausgangszustand vergleichbare Gen-Expression stattfindet. Ein kompletter Zyklus dauert somit ca. zehn Tage.

Die Aktivierung des reversen Tet-Systems hängt vor allem von der Geschwindigkeit der Aufnahme des Effektors Doxyzyklin ab, zusätzlich spielt aber auch die intrazelluläre Konzentration des Transaktivators eine Rolle. Um eine möglichst schnelle Induktion durch rtTA zu erreichen, kann man das Antibiotikum intraperitoneal als wässrige Lösung spritzen. Dosen von bis zu 4 mg pro Tag werden von Mäusen gut vertragen (die LD<sub>50</sub> beträgt 3mg Dox/g Körpergewicht bei intravenöser Gabe, Spielmann *et al.*, 1986).

Zur Messung der Induktionskinetik *in vivo* wurden 2mg Dox in 200µl steriler isotonischer Natriumchloridlösung in doppelt transgene rTA<sup>LAP</sup>-1/LC-1-Tiere *i.p.* injiziert. Die Biolumineszenz wurde zu verschiedenen Zeiten gemessen (Abb. 17).

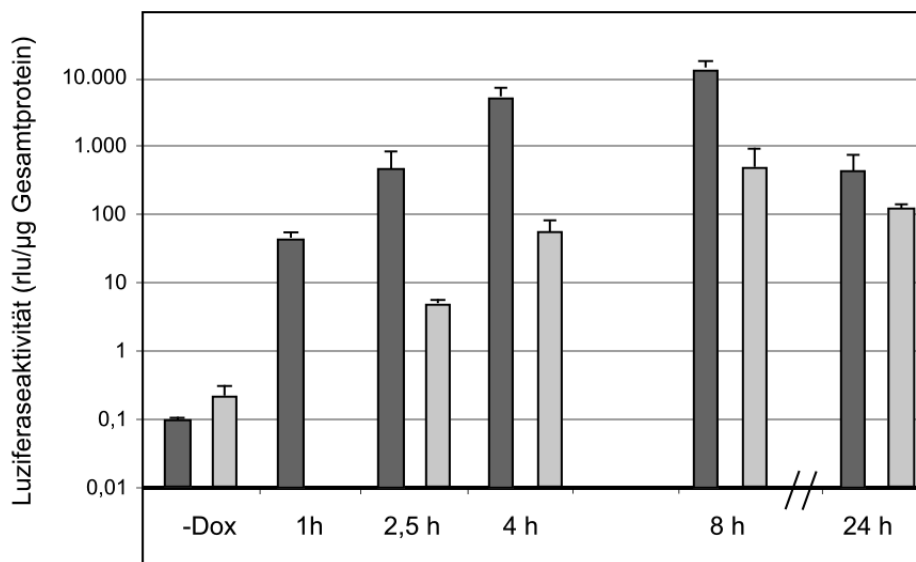


**Abb. 17 *In vivo*-Nachweis der Kinetik der Luziferase-Induktion in rTA<sup>LAP</sup>-1/LC-1-Tieren nach *i.p.*-Injektion von 2 mg Dox.**

Doppelt transgene rTA<sup>LAP</sup>-1/LC-1 Tiere wurden mit einer einmaligen Dosis von 2mg Dox *i.p.* injiziert und nach verschiedenen Zeitabständen (1h, 3h, 8h, 24h und 40h) analysiert. Eine Induktion der Luziferase-Expression ist etwa 1h nach der Injektion nachweisbar, das Maximum ist ca. acht Stunden später erreicht, nach weiteren 32 Stunden ist fast kein Signal mehr zu sehen.

Wie in Abb. 17 gezeigt, ist bereits nach einer Stunde ein Biolumineszenz-Signal zu erkennen. Die maximale Aktivität ist nach acht Stunden erreicht, sie bleibt in diesem Experiment bis zum 24-Stunden-Wert unverändert, nach 40 Stunden ist nur noch ein sehr schwaches Signal messbar. Der Versuch zeigt, dass ein kompletter Zyklus der Aktivierung und De-Aktivierung durch eine einmalige *i.p.*-Injektion von 2 mg Dox in TA<sup>LAP</sup>-2/LC-1 Tieren innerhalb von ca. 40 Stunden durchlaufen wird. Er zeigt weiterhin, dass intermediäre Expressionsniveaus durch eine partielle Induktion des Systems mit limitierenden Induktorkonzentrationen erreichbar sein sollten.

Die Auflösung des Biolumineszenz-Signals in Abb. 17 ist nicht ausreichend, um eindeutig zwischen einer Aktivität in der Leber und der Niere zu unterscheiden, in beiden Organen werden aber hohe Luziferase-Werte nach Induktion im Trinkwasser gemessen (Abb. 10). Um zwischen den Organen unterscheiden zu können, wurde eine quantitative Messung der Luziferaseaktivität in rTA<sup>LAP</sup>-1/LC-1-Tieren nach *i.p.*-Injektion von Dox vorgenommen. Dazu wurden rTA<sup>LAP</sup>-1/LC-1-Mäuse mit einer einmaligen Dosis von 2mg Dox injiziert, nach 1h, 2,5h, 4h, 8h und 24h getötet und anschließend die Luziferaseaktivität in Leber- und Nierenextrakten gemessen. Die Ergebnisse sind in Abb. 18 dargestellt.



**Abb. 18: Kinetik der Luziferaseinduktion in der Leber von rTA<sup>LAP</sup>-1/LC-1 Tieren nach *i.p.*-Injektion**

Doppelt transgene TA<sup>LAP</sup>-2/LC-1 Tiere wurden mit einer einmaligen Dosis von 2mg Dox *i.p.* injiziert und nach verschiedenen Zeitabständen (1h, 2,5h, 4h, 8h und 24h) getötet. Anschließend wurde die Luziferaseaktivität in Leber- bzw. Nierenextrakten gemessen und auf rlu/μg Gesamtprotein normiert. Als Vergleich ist der durchschnittliche Wert von LC-1 Tieren ohne Induktion angegeben (-Dox). Dunkelgraue Balken: Leber; Graue Balken: Niere. Für den 1h-Wert der Niere liegen keine Ergebnisse vor.

Die Ergebnisse zeigen, dass das Biolumineszenz-Signal hauptsächlich von der Leber ausgeht. In Abhängigkeit von der Zeit nach der Dox-Injektion steigt die Expression des Reportergens zunächst stark an. Schon nach einer Stunde ist eine signifikante Luziferaseaktivität in der Leber messbar (für die Niere liegen keine Daten für diesen Zeitpunkt vor), auch wenn sie nur etwa 0,3 % des Höchstwertes, der nach acht Stunden mit 13.000 rlu/ $\mu$ g erreicht wurde, betrug. Der 24-Stunden-Wert liegt für beide Organe in diesem Experiment wieder deutlich unter dem Höchstwert, er entspricht etwa der Aktivität, die 2,5 Stunden (Leber) bzw. vier Stunden (Niere) nach Induktion gemessen wurde. Da in diesem Experiment keine Messpunkte zwischen acht und 24 Stunden vorgenommen wurden, bleibt offen, ob der Wert bei acht Stunden bereits die maximale Aktivierung darstellt. Die Luziferase-Induktion in der Niere erreicht durch die einmalige Dox-Injektion maximale Werte von ca. 500 rlu/ $\mu$ g acht Stunden nach Beginn des Experiments.

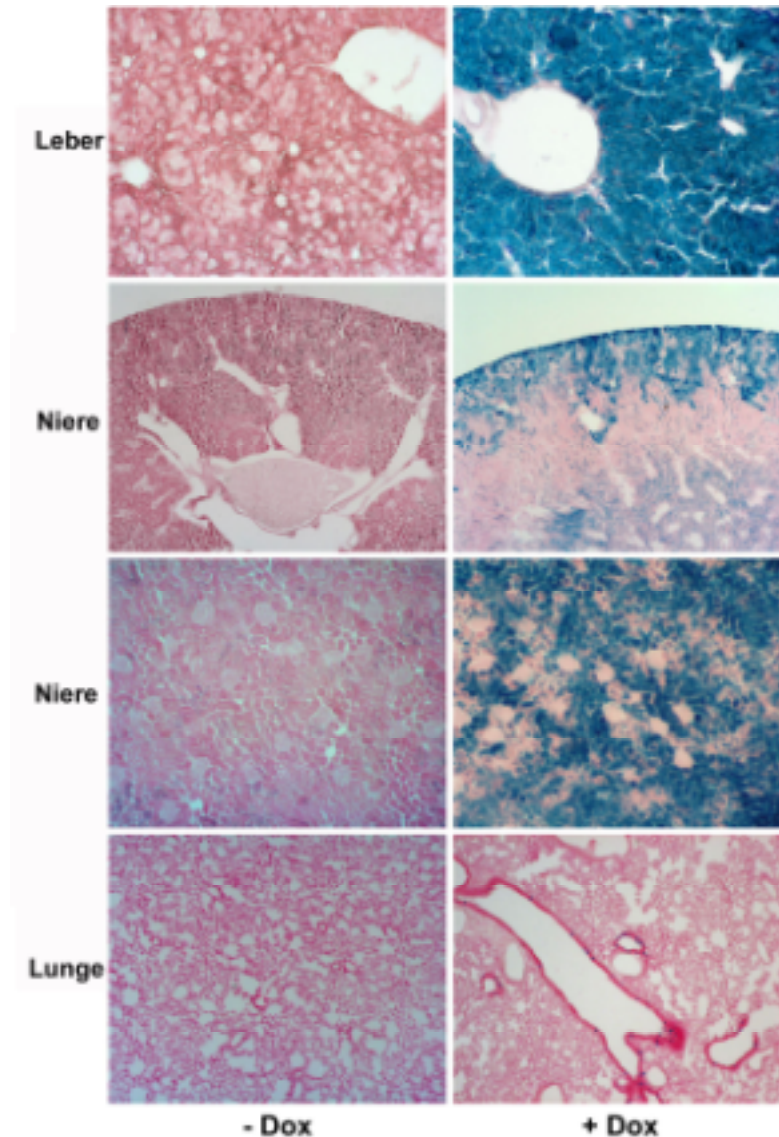
### **5.2.6 Tetrazyklin-induzierbare Rekombination in triple transgenen $rTA^{LAP}$ -1/LC-1/R26R-Mäusen**

#### **5.2.6.1 *In situ*-Analyse der Rekombination in Gewebeschnitten**

Die eigentliche Absicht bei der Herstellung der LC-1 Linie war die Etablierung eines Systems zur induzierbaren gewebespezifischen Rekombination. Durch die Wahl der Transaktivator-Linie kann bestimmt werden, in welchen Zellen der Maus die Rekombination stattfinden soll, während über die Applikation des Induktors ihr Zeitpunkt festgelegt wird.

Die  $rTA^{LAP}$ -1-Mauslinie eignet sich für einen Funktionstest von LC-1-Tieren besonders, da durch die Kombination der Linien  $rTA^{LAP}$ -1/LC-1 eine hohe Expression und dichte Kontrolle der *luc/cre*-Transkriptionseinheit in allen Hepatozyten und einigen Zellen der Niere demonstriert wurde. Zum Nachweis der Rekombination sollte der Mausstamm R26R verwendet und das Rekombinationsereignis in Gewebeschnitten verfolgt werden. Triple transgene Tiere der Linien  $rTA^{LAP}$ -1/LC-1/R26R wurden zur Induktion der Rekombinase mit 2 x 2mg Dox im Abstand von 24 Stunden *i.p.* injiziert. Nach den Injektionen wurde bis zur Analyse fünf weitere Tage gewartet, um eine ausreichende Ausprägung der  $\beta$ -Galaktosidase zu gewährleisten. Als Kontrolltiere dienten triple transgene Tiere, die nicht mit Dox-injiziert wurden (siehe Abb. 19).





**Abb. 19. *In situ*-Analyse der Rekombinase-vermittelten *lacZ*-Expression in Organen von triple transgenen  $rTA^{LAP}$ -1/LC-1/R26R-Mäusen.**

Zur Induktion der Cre-Rekombinase wurden triple transgene Mäuse ( $rTA^{LAP}$ -1/LC-1/R26R) mit 2 x 2mg Dox im Abstand von 24 Stunden *i.p.* induziert. Nach fünf Tagen wurden den Mäusen Organe zur Analyse entnommen (15-20µm dicke Gefrierschnitte, X-Gal-Färbelösung und Kernechtrot Gegengefärbung). Triple transgene Kontrolltiere bekamen keine Injektionen von Doxyzyklin, wurden aber sonst gleich behandelt.

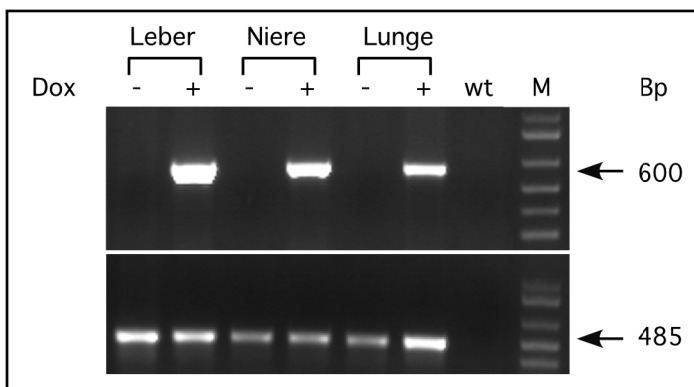
Das Muster der Rekombination in den triple transgenen Tieren (+ Dox) stimmt mit dem Expressionsprofil von  $rTA^{LAP}$ -1/nZL-2-Tieren (Abb. 13) überein. In der Leber sind alle Hepatozyten angefärbt, und in der Niere ist das Expressionsmuster auf kortikale Zellen beschränkt. Zusätzlich kann in einigen Zellen der Lunge Cre-Aktivität nachgewiesen werden. Hier handelt es sich wahrscheinlich um sporadische Rekombinationsereignisse von wenigen Zellen des Bronchien-Epithels, die allerdings nur in Dox-behandelten Mäusen entdeckt

wurden. Eine histologische Untersuchung der Lunge ergab, dass es sich hierbei um keinen spezifischen Zelltyp handelt. Es konnte aber ausgeschlossen werden, dass sich darunter Clara-Zellen und mukose Zellen befinden (H.-F. Gröne, DKFZ).

In unbehandelten Tieren konnte in keinem der Gewebeschnitte eine Blaufärbung, d.h. unkontrollierte Rekombinaseaktivität, festgestellt werden. In weiteren Experimenten wurde auch die Möglichkeit zu Rekombinationsinduktion während der Embryonalentwicklung untersucht. Zu diesem Zweck bekamen schwangere Weibchen (triple transgene  $rTA^{LAP-1/LC-1/R26R}$ -Tiere, die mit entsprechenden Männchen verpaart wurden) Dox im Trinkwasser (2mg/ml) verabreicht. In Abhängigkeit von Doxyzyklin konnte so ein Rekombinationsereignis in den Embryos am E14 induziert werden (Daten nicht gezeigt).

#### 5.2.6.2 PCR-Analyse der Cre-vermittelten Rekombination

Um die Ergebnisse der histologischen Untersuchungen auch auf DNA-Ebene zu überprüfen, wurde ein Nachweis des Rekombinationsereignisses mit Hilfe von PCR durchgeführt. Dazu wurden DNA aus Leber, Niere und Lunge aus den gleichen triple transgenen  $rTA^{LAP-1/LC-1/R26R}$ -Tieren aufgereinigt, die bereits analysiert wurden, wie in 5.2.6.1 beschrieben. Mit Hilfe von Primern, die im endogenen ROSA-Promotor (R26F2, Soriano, 1999) bzw. im *lacZ*-Gen (*lacZ4*) binden (siehe Abb. 2), kann durch eine PCR-Reaktion ein Rekombinationsereignis durch ein 600 Bp-Produkt nachgewiesen werden (Rijnkels & Rosen, 2001). Der entsprechende nicht-rekombinierte Locus würde in dieser Reaktion ein Produkt von ca. 3 Kb ergeben. Da in DNA-Proben aus fixiertem Gewebe eine PCR-Amplifikation nur bis ca. 800 Bp möglich ist (Rijnkels & Rosen, 2001), wird hier kein Produkt erwartet. Die Ergebnisse sind in Abb. 20 dargestellt.



**Abb. 20 PCR-Analyse der Cre-vermittelten Rekombination in  $rTA^{LAP-1/LC-1/R26R}$ -Mäusen**

Aus den fixierten Geweben der in Abb. 19 gezeigten Schnitte wurde DNA aufgereinigt und mit R26F2 und *lacZ4* Primern durch PCR amplifiziert. Das Produkt der Reaktion wurde in einem Agarosegel aufgetrennt. Nur in der DNA von Mäusen, die mit Dox behandelt wurden, kann das Rekombinationsprodukt von 600 Bp nachgewiesen werden. In einer Kontrollreaktion wurden interne *lacZ*-Primer

zur Detektion des *lacZ*-Gens (465 Bp-Bande) verwendet. Wt, Kontrollreaktion mit DNA nicht-transgener Mäuse; M, Marker.



Nur mit der DNA aus Gewebe von Dox-behandelten Mäusen kann ein 600 Bp PCR-Produkt amplifiziert werden, die nicht-induzierten Tiere (-Dox) sind negativ. Die hohe Sensitivität des PCR-Nachweises zeigt die Reaktion mit DNA aus der Lunge. Hier ist in Abb. 20 eine deutliche Bande zu sehen, obwohl nur wenige Zellen rekombiniert sind (siehe Abb. 19). Diese Ergebnisse bestätigen die histologischen Untersuchungen und zeigen, dass die Cre-Rekombinase in der LC-1 Mauslinie sehr dicht reguliert ist.

### 5.3 Klonierung und Charakterisierung des LC-1-Locus

In der Einleitung wurden die Probleme beschrieben, die nach Integration der  $P_{tet}$ -Expressionskassette in das Genom der Maus auftreten können. Im zweiten Teil der Arbeit sollte eine Möglichkeit gefunden werden, die Etablierung von Mauslinien mit Tet-regulierten Transgenen zu vereinfachen.

Wie durch die Experimente im ersten Teil der Arbeit gezeigt wurde, entsprechen die Regulationseigenschaften der LC-1-Linie den Ansprüchen, die man an ein konditionales Mausmodell stellt. Beide durch  $P_{tet}$ -bi-kontrollierten Gene dieser Mauslinie, *luc* und *cre*, lassen sich hoch exprimieren und zeigen im nicht-induzierten Zustand keine signifikante Aktivität. Die Ursache dieser Eigenschaften liegen im genomischen Locus, in den das Transgen integriert ist. Aus diesem Grund sollte im zweiten Teil dieser Arbeit der transgene Locus der LC-1-Linie kloniert und charakterisiert werden. Anschließend sollte der Frage nachgegangen werden, ob die Eigenschaften eines solchen Locus durch den Keimbahntransfer eines großen DNA-Fragmentes auf andere Mauslinien übertragbar sind.

#### 5.3.1 Klonierung des Integrationslocus der LC-1 Linie

Zur Isolierung des LC-1-Locus sollte die BAC-Technologie verwendet werden. Damit ist es möglich, DNA-Fragmente von mehreren 100 Kb zu klonieren. Fragmente dieser Größe sind in der Lage, nach genomischer Integration eine positionsunabhängige Transgen-Expression zu vermitteln (Giraldo & Montoliu, 2001), d.h. sie bilden eine eigene regulatorische Domäne aus. Um den LC-1-Locus als unabhängige Domäne auf neue Mauslinien zu übertragen, sollte das *luc/cre*-Transgen gemeinsam mit seinen flankierenden genomischen Sequenzen als ca. 100 Kb BAC-Fragment isoliert werden.

##### 5.3.1.1 Herstellung des BAC-Vektors *pBeloBAC-HD*

Zur Klonierung des LC-1-Locus konnte ich auf den BAC-Vektor *pBeloBACSB12* zurückgreifen (Tina Baldinger, Diplomarbeit Universität Heidelberg, 2000). *pBeloBACSB12* ist ein Derivat von *pBeloBAC11* (Wang *et al.*, 1997c), in dem einige Veränderungen vorgenommen wurden, um die Isolierung von genomischen Fragmenten zu erleichtern. Sein Grundgerüst entstammt einem Mini-F-Plasmid und enthält die zur Replikation notwendigen Elemente *oriS* und *repE* sowie die Gene *parA* und *parB*, die für die Aufrechterhaltung des Einzelkopiezustands verantwortlich sind (Shizuya *et al.*, 1992). Die wichtigste Neuerung, die in diesen Vektor von Tina Baldinger eingeführt wurde, ist das Prinzip, mit dem auf die Integration von großen genomischen DNA-Fragmenten selektioniert wird. Im Vektor

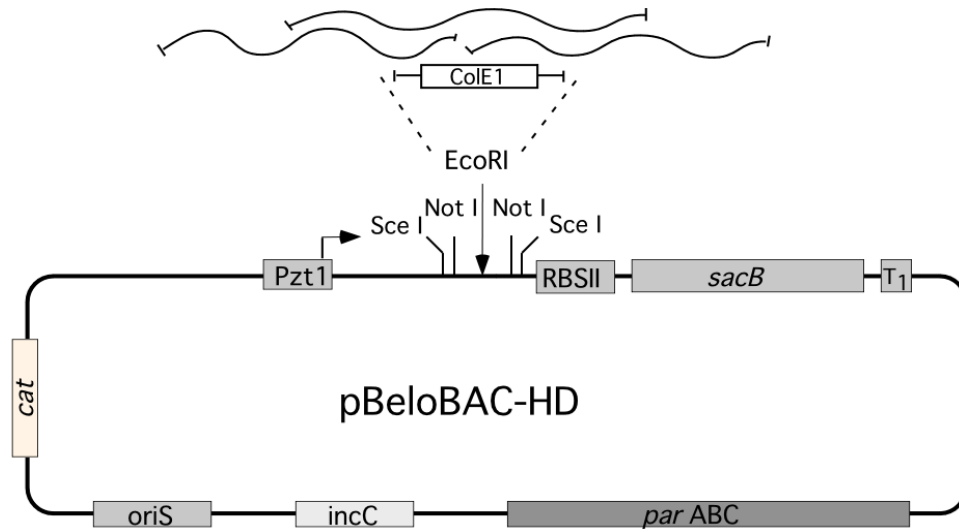
pBeloBAC11 wird die Klonierung von DNA-Fragmenten in die MCS („multiple cloning site“) des Vektors durch eine Blau-Weiß-Selektion erleichtert. In pBeloBACSB12 dient als Markierung nicht die *lacZ*-Funktion, sondern die des *sacB*-Gens aus *B. subtilis* (Gay *et al.*, 1983). Das Produkt des *sacB*-Gens, die Levansucrase ((2→6)- $\alpha$ -D-fructan: D-Glukose 6-fructosyltransferase), katalysiert die Umsetzung von Saccharose in das für *E.coli* toxische Levan. Durch Integration eines ausreichend großen DNA-Fragments in die MCS des Vektors wird das Transkriptions-Signal vom Translations-Startpunkt räumlich getrennt, sodass die Expression des *sacB* Gens unterbrochen wird. Durch Selektion in Gegenwart von Saccharose wachsen nur Zellen, die einen BAC mit ausreichend großen DNA-Fragmenten zwischen Promotor und *sacB*-Gen enthalten.

Die Klonierung von genomischen Fragmenten mittels pBeloBAC12 erwies sich als effizient: Bei einer Analyse von über 40 Klonen wurde kein Vektor ohne Integrat identifiziert. Die MCS, in die das genomische DNA-Fragment eingefügt werden kann, hat eine zentrale *EcoRI*-Schnittstelle, die zu beiden Seiten von je einer *NotI*- und einer *SceI*-Erkennungssequenz flankiert ist (siehe Abb. 21). *NotI* ist ein selten schneidendes Restriktionsenzym, welches statistisch im Mausgenom nur ca. alle 120.000 Bp vorkommt (New England Biolabs Katalog) und deshalb dazu verwendet werden kann, BACs zu charakterisieren bzw. das klonierte Fragment aus dem Vektor in einem Stück freizusetzen. Alternativ kann dazu auch die Restriktionsschnittstelle *SceI* verwendet werden, für die in Säuger-Genomen bisher keine Erkennungsstelle gefunden wurde.

Im ursprünglichen Vektor pBeloBAC11 (und damit auch in pBeloBAC12SB) ist eine *loxP*-Sequenz enthalten. Um zu einem späteren Zeitpunkt ein *loxP*-flankiertes Transgen in das genomische BAC-Fragment einfügen zu können, sollte diese Erkennungsstelle der Cre-Rekombinase eliminiert werden. Dazu wurde eine PCR-Strategie gewählt, bei der in dem Konstrukt pBeloBACSB12 56 Bp verloren gingen. Dieser Vektor wurde mit pBeloBAC12SB $\Delta$ loxP bezeichnet.

Ein weiteres Problem bei der Herstellung einer BAC-Bank ist initial die präparative DNA-Aufreinigung des Klonierungsvektors. Da BAC-Vektoren nur in ein bis zwei Kopien pro Zelle vorkommen, ist die DNA-Ausbeute gering und Kontaminationen mit chromosomaler Bakterien-DNA sind häufig. Für die erfolgreiche Herstellung einer BAC-Bank ist aber ein hoch gereinigter linearer Vektor wichtig. Aus diesem Grund sollte in die *EcoRI*-Erkennungsstelle der MCS ein *ColE1*-Replikationsursprung eingefügt werden, der zu einer hohen Kopienzahl des Vektors in den Bakterien führt.

Zur Klonierung des Replikationsursprungs in den BAC-Vektor wurde das ColE1-Fragment mit Hilfe von zwei Primern, die an ihren Enden EcoRI-Erkennungsstellen tragen, durch PCR aus dem Plasmid pZE12-luc (Lutz & Bujard, 1997) amplifiziert. Mit Hilfe eines EcoRI-Verdau konnte das PCR-Produkt in den mit EcoRI linearisierten pBeloBAC12SB $\Delta$ loxP eingesetzt werden, was zur Herstellung des Vektors pBeloBAC-HD führte (eine detaillierte Plasmid-Karte befindet sich im Anhang). Durch den Verdau mit EcoRI bei der Herstellung der BAC-Bank wird das ColE1-Fragment wieder freigesetzt (Abb. 21).



**Abb. 21 Schematische Darstellung des Vektors pBeloBAC-HD**

Dieser Vektor zur Klonierung von großen DNA-Fragmenten basiert auf pBeloBAC11, er trägt an Stelle des lacZ- $\alpha$ -Fragments eine *sacB*-Selektionskassette mit einem Pzt1-Promotor (Lutz & Bujard, 1997) und veränderter MCS. Das Plasmid enthält den Replikationsursprung des F-Faktors (*oriS*) und die Stabilitätsgene *parA*, *parB* und *parC*. Zur Erleichterung der präparativen Aufreinigung wurde der ColE1-Replikationsursprung in die MCS eingefügt, vor der Klonierung von genomischen Fragmenten wird er durch EcoRI-Verdau entfernt.

### 5.3.1.2 Herstellung der LC-1 BAC-Bank

Die Herstellung und das Durchsuchen der BAC-Bank wurde zum Teil während eines Aufenthalts im Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung (RZPD) in Berlin durchgeführt. Einzelheiten zu den verwendeten Techniken bei der Generierung der BAC-Bank finden sich im Methodenteil bzw. in Osoegawa *et al.*, 1998. Aus diesem Grund beschränke ich mich hier auf eine kurze Zusammenfassung.

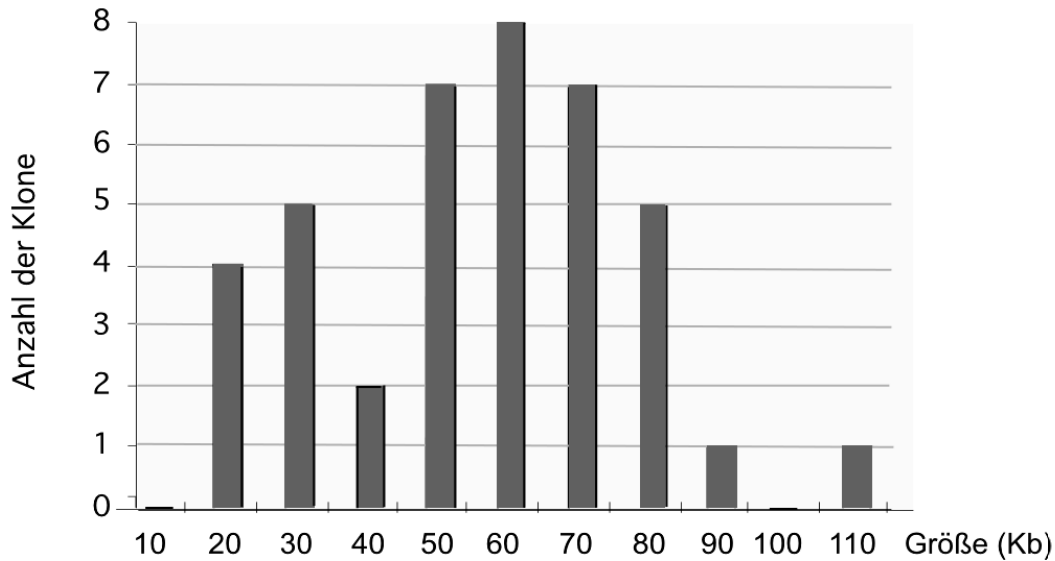
Genomische DNA-Fragmente mit der Größe von 100 Kb können nicht mit einem normalen Restriktionsverdau erzeugt werden, da die entstehenden Fragmente zu klein sind. Statistisch kommt z.B. eine EcoRI-Schnittstelle im Mausgenom alle 4000 Bp vor (New England BioLabs Katalog). Deshalb werden partielle Verdau der genomischen DNA zur Klonierung von großen Fragmenten verwendet. Für EcoRI ist ein partieller Verdau mit Hilfe einer

spezifischen DNA-Methylase möglich. Dieses Enzym modifiziert die Erkennungssequenz von EcoRI mit Methylgruppen und verhindert auf diese Weise das Schneiden durch das Restriktionsenzym (McClelland, 1981). Werden beide Enzyme kombiniert, können die Reaktionsbedingungen des genomischen Verdaus so eingestellt werden, dass nur wenige EcoRI-Schnittstellen erkannt werden. In meinen Experimenten ergab ein Verhältnis von 1:20 (Endonuklease zu Methylase) die Fragmentierung der genomischen DNA in ausreichend große Stücke (100-200 Kb, Daten nicht gezeigt).

Nach dem partiellen EcoRI-Verdau der genomischen LC-1-DNA wurden die Restriktionsfragmente durch Pulse-Feld-Gelelektrophorese (PFGE) aufgetrennt. Anschließend wurden die Agarosestücke mit DNA-Fragmenten der Größe von 100-250 Kb aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe von Elektro-Elution daraus isoliert. Der Vektor pBeloBAC-HD wurde ebenfalls mit EcoRI verdaut, dephosphoryliert und aufgereinigt. Die Ligation des BAC-Vektors mit der genomischen DNA fand bei 16°C über Nacht in einem Volumen von 50µl statt. 2 µl des Ligations-Ansatzes wurden nach Dialyse gegen 0,5 x TBE zur Transformation von DH10B-Zellen durch Elektroporation verwendet. Nach Ausplattieren des Transformationsansatzes wurden im Durchschnitt 1000-2000 Kolonien pro Elektroporation gezählt.

#### ***5.3.1.3 Bestimmung der durchschnittlichen Größe der DNA-Fragmente in der BAC-Bank***

Um die Effizienz der Klonierung und die Größe der eingebauten genomischen Fragmente in der BAC-Bank zu überprüfen, wurden zufällig 40 Klone ausgewählt und mit Hilfe eines NotI-Verdaus und PFGE analysiert (siehe Abb. 22). In allen Klonen mit einer Vektorbande konnte auch ein freigesetztes Stück Fremd-DNA identifiziert werden. Nur ein geringer Prozentsatz der resistenten Klone (ca. 5-10%) enthielt keinen Vektor.



**Abb. 22 Größenverteilung der genomischen DNA-Fragmente in der LC-1 BAC-Bibliothek**

Die DNA aus 40 zufällig ausgewählten BAC-Klonen wurde aufgereinigt und mit NotI geschnitten. Durch PFGE lässt sich anschließend die Größe der klonierten DNA bestimmen. Die Größe ist gegen die Anzahl der entsprechenden Klone (aus 40) aufgetragen.

Aus Abb. 22 ist zu erkennen, dass die durchschnittliche Fragmentgröße der BAC-Bank ca. 60.000 Bp beträgt. Das Genom der Maus ist ca.  $2,6 \times 10^9$  Bp groß. Daraus ergibt sich, dass für eine einfache Abdeckung des Genoms mit dieser BAC-Bank etwa 40.000 Klone benötigt werden. Nimmt man an, dass für die Identifikation eines entsprechenden Klon aber eine 3-4fache Abdeckung notwendig ist, müssen über 120.000 Klone durchsucht werden.

#### 5.3.1.4 Identifikation positiver Klone

Da die Identifikation positiver BACs auf Einzel-Klon-Ebene sehr aufwändig ist, wurden 1000-2000 Klone vereinigt und gleichzeitig mittels PCR untersucht (siehe Fluss-Diagramm Abb. 23). Bei einem positiven Signal eines Pools für das *luc*- und *cre*-Gen wurde dieser verdünnt und erneut ausplattiert. Anschließend wurde etwa die 2-3fache Menge der Originalklone (3000-4000 Kolonien) Roboter-unterstützt gepickt (Roboter QPix, Genetix) und in 386-Loch-Platten überführt. Von diesen Platten wurden identische Kopien erstellt, die Duplikate erneut vereinigt und mit Hilfe von PCR durchsucht. Nach Identifikation einer positiven Platte wurden mit der Original-Platte weitere PCR-Analysen durchgeführt, bis der positive Klon gefunden war.

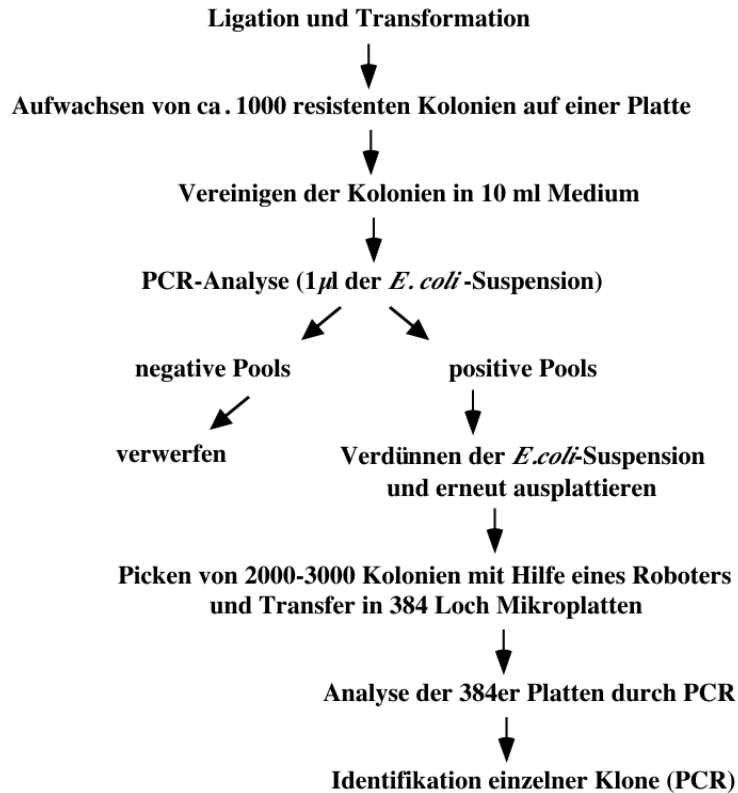


Abb. 21 Strategie zur Identifikation von PCR-positiven Klonen in der BAC-Bank

Durch diese Strategie konnten innerhalb von vier Wochen insgesamt etwa 70.000 Klone untersucht werden. Sechs *cre*- und *luc*-positive Klone wurden identifiziert und nach ihrer Lokalisierung in der jeweiligen 384-Loch-Platte als BAC C10, E11, F24, M9, O7 und P18 bezeichnet. Die Klone C10 und F24 bzw. E11 und M9 wurden jeweils gemeinsam in einem Pool gefunden, nach Restriktionsverdau und PFGE zeigten sie auch ein identisches Fragmentmuster. In der Annahme, dass es sich hier um identische Klone handelte, wurden nur die Klone F24 und E11 weiterverfolgt. In Abb. 24 sind verschiedene BAC-Klone nach NotI-Verdau und PFGE dargestellt.

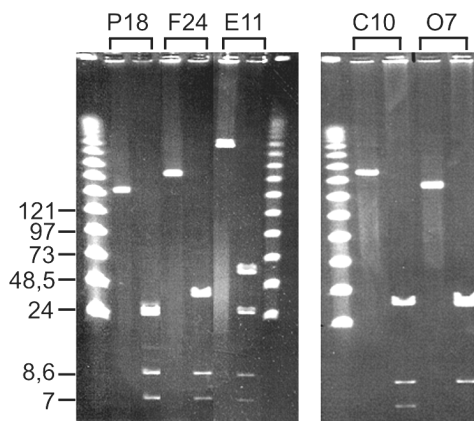


Abb. 24: Größenbestimmung der *cre*- und *luc*-positiven Klone durch NotI-Verdau und PFGE

Ca. 2 µg der BAC-DNA wurde mit NotI geschnitten und die Fragmente durch PFGE aufgetrennt. Die Vektorbande läuft bei ca. 8,6 Kb, eine weitere Bande (ca. 7 Kb) ist in drei der Klone sichtbar. Ein zusätzliches kleines 3,8 Kb-Fragment der BACs F24, C10 und P18 ist in dieser Abbildung nicht zu erkennen. Ungefähre Größe der BAC-Fragmente (ohne Vektor): P18, 35 Kb; F24 (C10), 52 Kb, E11, 97 Kb, O7, 38 Kb. Auf die linke Spur wurde jeweils unverdaute BAC-DNA aufgetragen.

Der NotI-Verdau trennt in der BAC-DNA das genomische Fragment vom Vektor. Letzter ist als 8,6 K-Bande in allen Verdaus erkennbar. In den Klonen E11 (M9), F24 (C10) und P18 ist eine zusätzliche gemeinsame Bande zu sehen, die etwa bei 7 Kb läuft. E11 wird in zwei weitere große Fragmente von ca. 28 und 62 Kb unterteilt, in den anderen BACs ist nur ein weiteres Fragment zu erkennen, das ca. 41 Kb (F24), 38 (O7) und 24 Kb (P18) groß ist. In den Klonen F24 (C10) und P18 tritt ein weiteres Fragment von ca. 3,8 Kb auf, welches in Abb. 24 nicht zu sehen ist.

### 5.3.1.5 Aufbau und genomische Lokalisierung der BACs

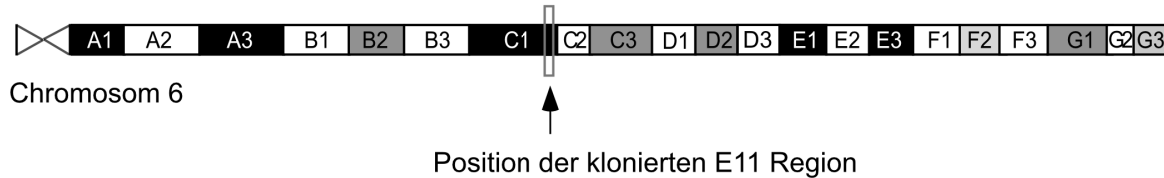
Um die *luc/cre*-Transkriptionseinheit in den BACs zu lokalisieren und die chromosomale Integrationsstelle der LC-1 Linie zu identifizieren, sollten Teile der BACs sequenziert werden. Mit Primern, die im Vektor pBeloBAC-HD binden und von beiden Seiten in die klonierte Maus-DNA hineinlesen (Primer SchoBAC 2 bzw. Seq-BAC1), sollte es möglich sein, Sequenzinformationen über das 5' und 3' Ende der eingebauten DNA-Fragmente der BACs zu erhalten. Für diese Analyse wurden die Klone P18, F24 und E11 verwendet. Parallel dazu wurde versucht, mit Primern, die von der *cre*- bzw. *luc*-Expressionskassette aus in die flankierenden Sequenzen lesen, die Integrationsstelle im BAC bzw. im Mausgenom zu bestimmen (Primer Scho2hGH, Scho3hGH2, und rSV40).

Durch Sequenzierungen mit den Primern SchoBAC 2 bzw. Seq-BAC1 konnten von den BACs E11, F24 und P18 die Randsequenzen erhalten werden. Die Sequenzierungen mit den internen Primern ergaben keine verwertbaren Resultate. Aus diesem Grund wurden die drei NotI-Fragmente des BAC E11 subkloniert und vom Vektor aus sequenziert. Es ergab sich, dass es sich bei dem 7 Kb-Fragment (das den Klonen P18, F24 und E11 gemeinsam ist) um ein vollständiges LC-Konstrukt handelt, das ursprünglich als NotI-Fragment zur Mikroinjektion verwendet wurde (siehe Abb. 5). Durch Ansequenzieren der 28 und 62 Kb-Fragmente in den Subklonen konnte jeweils eines der Enden ebenfalls als Teil von weiteren LC-Konstrukten identifiziert werden. Das andere Ende entsprach den Rand-Sequenzen des E11 BACs. Um diese Schlüsse zu bestätigen, wurde das 27 Kb- bzw. 62 Kb-Fragment mit EcoRI verdaut und in pBluescript erneut subkloniert. Mit Hilfe von Bluescript T3- bzw. T7-Primern konnten so weitere Sequenzdaten erhalten werden. Die Sequenz-Informationen wurden mit der Celera- und der ENSEMBL-Mausdatenbank verglichen ([http://www.ensembl.org/Mus\\_musculus/](http://www.ensembl.org/Mus_musculus/)), es zeigte sich, dass der Integrationsort des LC-1-Transgens und die komplette Sequenz der BACs bekannt sind. Er liegt in der C1-Region auf Chromosom 6, siehe Abb. 25-A. BAC E11 deckt den Bereich von Position 67079195 bis 67154665 ab (MapElement NW 000251), dies entspricht etwa 75.600 Basenpaaren. Eine exakte Größenangabe ist nicht möglich, da sich kurze Bereiche in dem DNA-Abschnitt

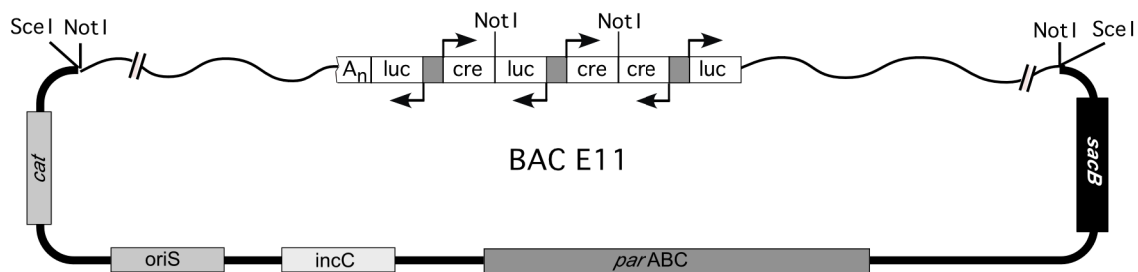


befinden, deren Sequenz noch nicht genau bestimmt werden konnte. Aus der Sequenz-Analyse geht jedoch hervor, dass im BAC E11 drei vollständige Kopien der *luc/cre*-Transkriptionseinheit in Tandem integriert sind. Die mittlere Einheit lässt sich durch den Verdau mit NotI herauslösen. Am 5'-Ende der eingebauten LC-Einheiten befindet sich zusätzlich noch ein Teil einer vierten LC-Kassette, von der jedoch nur das hGH-Polyadenylierungssignal eingebaut wurde (siehe Abb.25-B und 26).

A.



B.

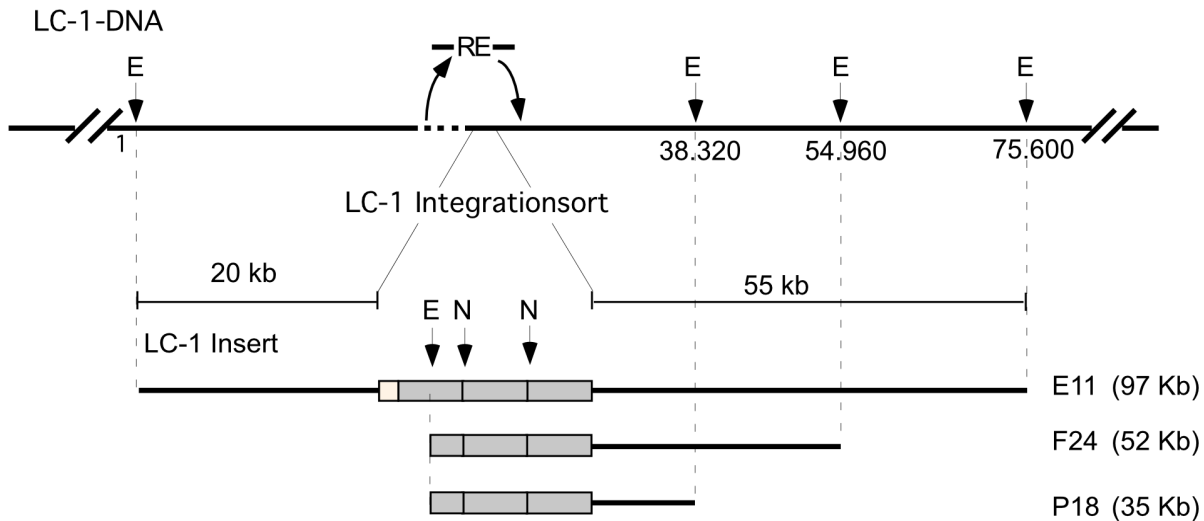


**Abb. 25 : Genomischer Integrationsort der LC-1 Linie und Schematische Darstellung des BAC E11**

A) Der Integrationsort des LC-1-Transgens liegt am Ende der C1-Region auf Chromosom 6.

B) Im klonierten LC-1-Locus sind drei Kopien des LC-Not I Fragmentes in Tandem integriert, eine der Kopien lässt sich durch NotI-Verdau herauslösen. Von einer weiteren Kopie ist am 5'-Ende nur noch ein Teil des hGH-Polyadenylierungssignals ( $A_n$ ) erhalten geblieben. Die flankierenden genomischen Regionen sind ca. 20 Kb und 55 Kb groß.

Die BACs F24 und P18 stellen im Prinzip Teile des E11-BACs dar, ihr 5'-Ende beginnt in einer der *luc/cre*-Transkriptionseinheiten, die im LC-1-Locus in Tandem integriert sind. Dies wird in Abb. 26 verdeutlicht.



**Abb. 26: Vergleich der BACs P18, F24 und E11**

Im oberen Teil der Abb. ist der wt-Locus, in den die LC-Fragmente integriert sind, dargestellt. Position 1 bezeichnet das 5'-Ende der genomischen Sequenz, die im BAC E11 kloniert wurde, Position 75.600 das 3'-Ende, wie es durch Sequenzierung des BAC E11 bestimmt wurde. Die Integrationsstelle der drei in Tandem angeordneten *luc/cre*-Transkriptionseinheiten liegt etwa bei Position 20.000. An dieser Stelle wurde ein 2.000-3.000 Bp-langes DNA-Fragment (RE) rearrangiert. Der untere Teil zeigt, welcher Sequenzbereich durch die Klone F24 und P18 abgedeckt wird. E, EcoRI; N, Not I.

Bei der Analyse der Sequenzdaten fiel auf, dass im BAC E11 am Integrationsort ein ca. 2-3 Kb langes DNA-Fragment (RE) im Vergleich zu den Sequenzdaten der Celera bzw. ENSEMBL-Sequenzen rearrangiert ist (siehe Abb. 26). Alle weiteren Sequenzen der Subklone stimmten mit der Datenbank überein.

### 5.3.2 Funktionale Charakterisierung der BACs

#### 5.3.2.1 Zellkulturexperimente

Um zu überprüfen, ob die BAC-Klone auch funktionale Tet-regulierbare Luziferase-Konstrukte enthalten, wurden zunächst HtTA-Zellen, die stabil integriert das *tTA*-Gen unter der Kontrolle von  $P_{hCMV}$  exprimieren (Gossen & Bujard, 1992) mit BAC-DNA transfiziert. In diesen Experimenten konnte mit allen Konstrukten (E11, F24, O7 und P18) eine Dox-abhängige Kontrolle der Luziferaseaktivität gezeigt werden (Daten nicht gezeigt).

Ein erster Hinweis, ob sich die Eigenschaften des LC-1-Locus auch auf andere genomische Integrationsstellen übertragen lassen, kann durch die Herstellung von stabilen Klonen überprüft werden. Zur Etablierung von stabilen Klonen wurden nur die beiden größten BACs F24 und E11 verwendet. Mit Hilfe der *SceI*-Schnittstellen wurde das F24- und E11-Fragment isoliert und zusammen mit einem linearisierten Hygromyzin-Resistenzplasmid (pX343) in die

HtTA-Zellen transfiziert. Durch Selektion auf Hygromycin konnten so stabile Klone gewonnen werden. Die quantitative Analyse dieser Klone in An- und Abwesenheit von Doxyzyklin ergab, dass eine hohe Anzahl von Klonen mit beiden BAC-Fragmenten eine effiziente Regulation der Luziferase erlaubte (Daten nicht gezeigt). In 13 aus 16 resistenten Klonen, die mit dem F24-Fragment hergestellt wurden, konnte eine Doxyzyklin-abhängige Kontrolle der Luziferaseaktivität gemessen werden. Die Regulationsfaktoren bewegten sich hier zwischen 60 und 3000fach. Funktionale E11-Klone wurden vor der quantitativen Messung „*in vivo*“ durch den Nachweis der Luziferase-vermittelten Biolumineszenz ausgesucht. Ca. 30% (31 Klone aus 95) wurden in diesem Experiment als positiv identifiziert. Im Durchschnitt konnte die Aktivität der Luziferase in diesen Klonen 548fach in Abhängigkeit von Dox reguliert werden. Die weitere Analyse einiger Klone nach einem Monat in Kultur ergab, dass die *luc*-Expression (und damit das Regulationspotential) in vielen Klonen stark gesunken war. Der Ansatz auf zellulärer Ebene wurde nicht weiterverfolgt, da die Funktion des E11-Fragments belegt war.

#### **5.3.2.2 Herstellung transgener Mäuse mit dem E11 BAC**

Um die Hypothese zu überprüfen, ob es mit Hilfe der BAC-Technologie möglich ist, die Eigenschaften des LC-1-Locus auf andere Mauslinien zu übertragen, sollten transgene Mäuse mit intakten BAC-Fragmenten hergestellt werden, die nach entsprechender Verpaarung mit tTA/rtTA-Mauslinien charakterisiert werden sollten.

Nur im BAC E11 ist die LC-Transkriptionseinheit von beiden Seiten von genomischen Sequenzen flankiert, aus diesem Grund wurde nur das E11-Fragment zur Mikroinjektion in befruchtete Maus-Oozyten eingesetzt. Vor der Injektion zur Etablierung der transgenen Linien wurde das 95 Kb-Fragment durch einen *SceI*-Verdau vom Vektor getrennt und durch PFGE und Agarase-Verdau aufgereinigt. Anschließend wurde es gegen Injektionspuffer dialysiert und auf eine DNA-Konzentration von 1-2µg/ml eingestellt. Aus dem Transfer der injizierten Oozyten gingen 35 Tiere hervor, von denen zehn in der PCR-Analyse ein positives *luc*- und *cre*-Signal zeigten. Um festzustellen, ob das E11-Fragment in den Stammtieren vollständig integriert ist, wurden Primer, welche spezifisch an die *SceI*-Schnittstelle am 5'- und 3'-Ende der 95 Kb-Sequenz binden, sowie zwei weitere Primer, die homolog zu den Randsequenzen der genomischen DNA im E11-Fragment sind, eingesetzt. In sieben der Stammtiere konnte so die komplette Integration des 95 Kb-Fragmentes nachgewiesen werden. In den restlichen Stammtieren wurden Deletionen an einem oder beiden Enden der 95 Kb-Sequenz identifiziert (siehe Abb. 27).

Stammtier Nr. :	PCR-Primer:				Verpaarung mit tTA-Linie:
357.3	+	+	-	-	-
358.1 (E 11-1)	+	+	+	+	+
359.1	+	+	+	+	keine Weitergabe des Transgens
360.3 (E11-2)	+	+	+	+	+
360.6	+	+	+	-	-
364.4 (E11-3)	+	+	+	+	+
366.2 (E11-4)	+	+	+	+	+
367.1	+	+	-	+	-
368.2 (E11-5)	+	+	+	+	+
368.4 (E11-6)	+	+	+	+	+
	<i>luc</i>	<i>cre</i>	5' Ende	3' Ende	

Abb. 27: Analyse der Stammtiere mit Hilfe von PCR

### 5.3.2.3 Analyse von primären Mausohr-Fibroblasten-Kulturen der E11-Stammtiere

Um schon in diesen Tieren auch eine Aussage über die Funktionalität der integrierten BAC-Fragmente machen zu können, wurden primäre Fibroblasten-Kulturen aus Ohrgewebe (MOF-Zellen) der Stammtiere etabliert, die anschließend mit einem  $P_{hCMV}$ -tTA Konstrukt transfiziert wurden. Die Ergebnisse sind in Abb. 28 dargestellt. In allen untersuchten MOF-Kulturen konnte eine Dox-abhängige Aktivität der Luziferase festgestellt werden. Da die Ergebnisse durch zwei getrennte Transfektionsrunden erhalten wurden, sind die absoluten Werte untereinander nicht direkt vergleichbar. Mit einer Ausnahme wurde in allen Kulturen eine niedrige Hintergrundexpression bei gleichzeitig hoher Induktion der Luziferase gemessen, sodass eine Genregulation über 3-4 Größenordnungen möglich war. Nur die Fibroblasten aus dem Ohrgewebe des Stammtieres 360.6 zeigten eine signifikante Basalaktivität. In diesem Tier wurde durch die PCR-Analyse nur eine partielle Integration des BACs festgestellt. Für das Stammtier 366.2 (Linie E11-4) liegen keine Ergebnisse vor, da die Kultur mit Bakterien kontaminiert war.

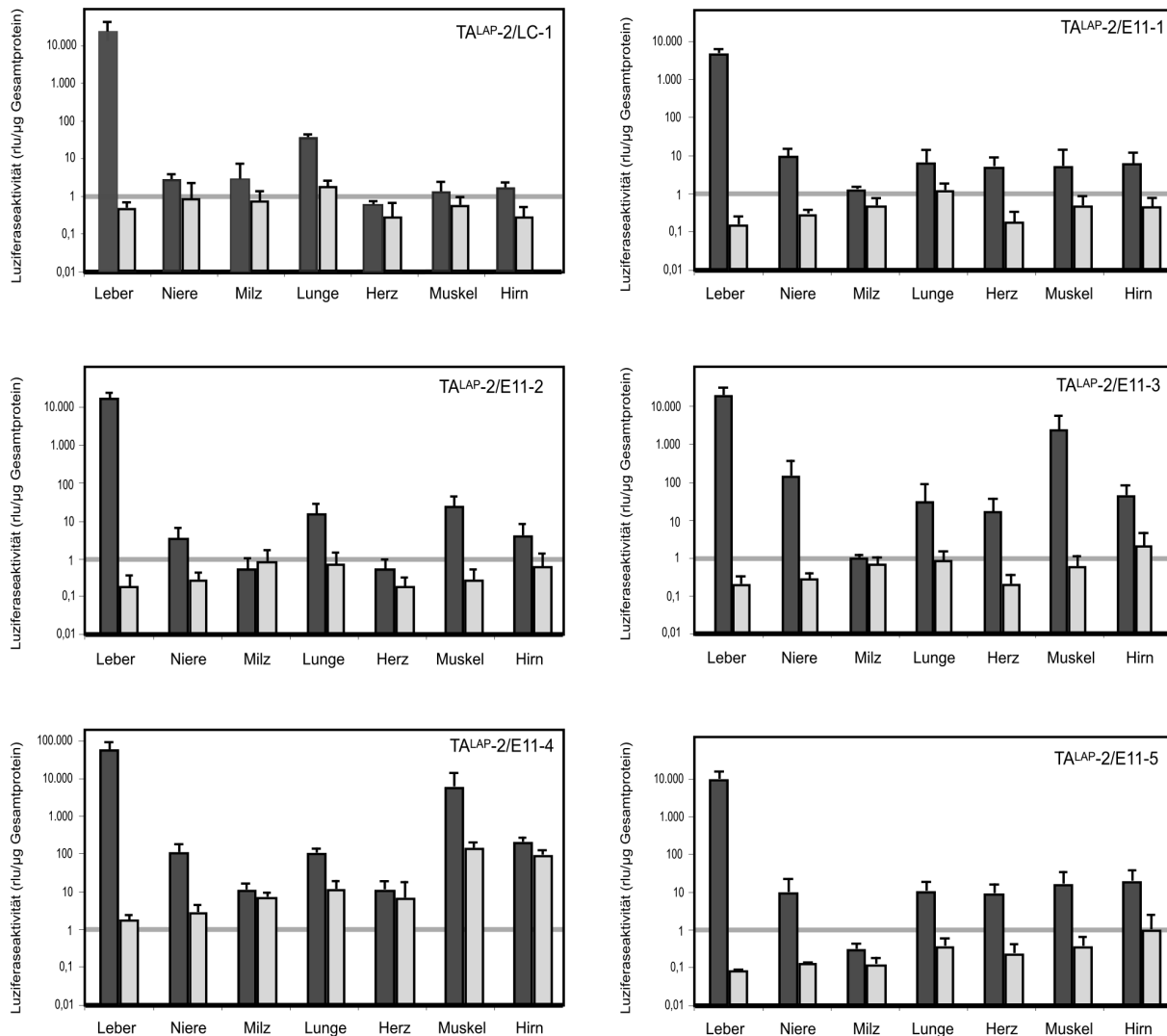
Stammtier Nr.	Luziferaseaktivität (rlu)		Regulationsfaktor
1. Transfektion	+ Dox	- Dox	
357.3	17	115010	6765
358.1 (E11-1)	38	671672	17676
359.1	53	160583	3030
360.3 (E11-2)	1	79071	79071
367.1	1	81221	81221
368.2 (E11-5)	39	161239	4134
2. Transfektion			
360.6	4375	454860	104
364.4 (E11-3)	113	488204	4320
366.2 (E11-4)	n.d.	n.d.	n.d.
368.4 (E11-6)	74	515563	6967

**Abb. 28: Regulation der Luziferaseaktivität in MOF-Zellen der E11-Stammtiere nach Transfektion mit einem tTA-Expressionsplasmid**

MOF-Kulturen der E11-Stammtiere wurden isoliert und in 3,5 cm Schalen zu 80% konfluent aufgewachsen und mit einem  $P_{hCMV}$ -tTA-Plasmid (pUHD15-1) transfiziert. Nach 24h wurde die Luziferaseaktivität in den Zellextrakten in Abhängigkeit von Doxyzyklin gemessen. Die Transfektion wurde in zwei getrennten Experimenten durchgeführt.

#### 5.3.2.4 Analyse der E11-Stammtiere durch Verpaarung mit Transaktivator-Mäusen

Zur Analyse ihrer Regulationseigenschaften wurden alle sieben E11-Stammtiere, die ein vollständiges E11-Fragment enthielten, mit Individuen der  $TA^{LAP-2}$ -Linie verpaart, die tTA spezifisch in Hepatozyten ausprägen. Mit Ausnahme von Stammtier 359.1 gaben alle Tiere ihr Transgen in die nächste Generation weiter. Die hieraus abgeleiteten sechs Linien wurden mit E11-1 bis 6 bezeichnet (Abb. 27).  $TA^{LAP-2}$ /E11 doppelt transgene Mäuse wurden für zwei Wochen mit 2 mg/ml Dox getränkt bzw. mit Dox-freiem Trinkwasser gehalten und anschließend analysiert (Abb.29).



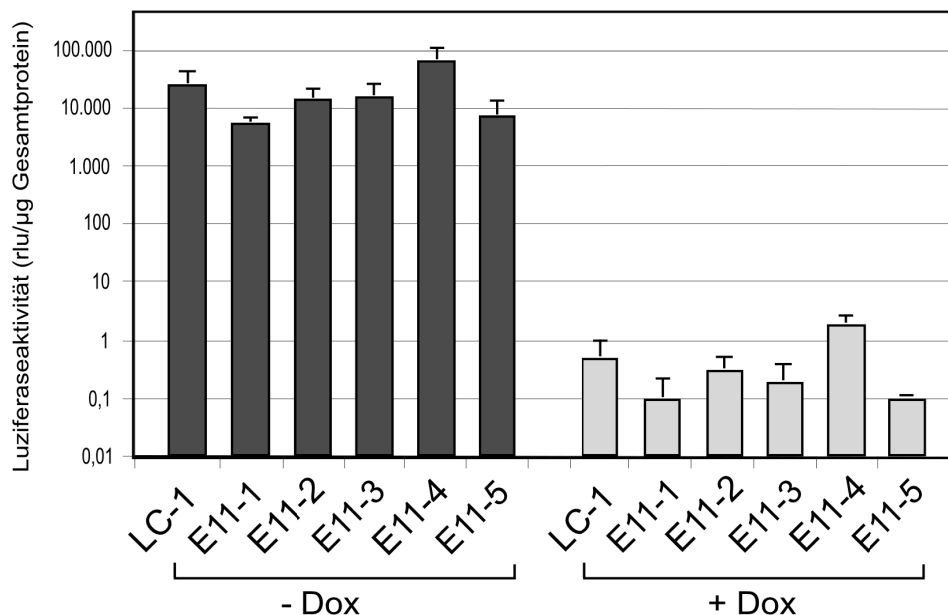
**Abb. 29: Luziferaseaktivität in Organextrakten von TA<sup>LAP</sup>-2/E11-Mäusen +/- Doxyzyklin.**

Gruppen von doppelt transgenen-Tieren der Linien TA<sup>LAP</sup>-2/E11-1 (-Dox n=4; +Dox n=3), TA<sup>LAP</sup>-2/E11-2 (-Dox n=5, +Dox n=4), TA<sup>LAP</sup>-2/E11-3 (-Dox n=4, +Dox n=4), TA<sup>LAP</sup>-2/E11-4 (-Dox n=4; +Dox n=4), und TA<sup>LAP</sup>-2/E11-5 (-Dox n=5; +Dox n=3) wurden für zwei Wochen mit 2mg/ml Dox getränkt bzw. bekamen Dox-freies Trinkwasser. Dunkle Säulen repräsentieren unbehandelte, helle Säulen Doxyzyklin-getränkte Tiere. Nach zwei Wochen wurde die Luziferaseaktivität als rlu/μg in Organextrakten bestimmt. Zum Vergleich sind oben links die Werte der TA<sup>LAP</sup>-2/LC-1-Tiere aus Abb. 8 dargestellt.

Die Ergebnisse dieser Versuche zeigen, dass in allen sechs Linien Luziferaseaktivität in der Leber über vier Größenordnungen reguliert werden kann (siehe auch Abb. 30). In drei Linien findet man aber (Dox-kontrollierte) Luziferaseaktivitäten in anderen Organen. Die Linien E11-3, E11-4 und E11-6 zeigen z.B. auch im Muskel signifikante Luziferaseinduktion, in E11-6/TA<sup>LAP</sup>-2-Mäusen sind zusätzlich noch die Werte in der Niere erhöht. In den anderen Organen, Herz, Milz und Hirn, werden in allen Linien auch im induzierten Zustand nur

geringe Aktivitäten gemessen. In Anwesenheit von Dox (Trinkwasser) geht in allen Linien, mit Ausnahme der E11-4-Linie, die Luziferaseaktivität in den verschiedenen Organen auf das Hintergrundniveau der LC-1-Linie zurück. Interessanterweise zeigt die E11-4-Linie nicht nur durchweg höhere Basalwerte, sondern auch die höchsten induzierten Luziferaseaktivitäten. Eine weitere Linie, die durch ihre hohen Luziferasewerte insbesondere in Niere und Muskel auffällt, ist die E11-6-Linie. Tiere dieses Stammes geben das Expressionsmuster allerdings nicht in die F2-Generation weiter, sodass sich eine weitere Diskussion dieser Resultate erübrigt.

In Abb. 30 ist die Luziferaseinduktion in der Leber der E11-1 bis E11-5-Linien vergleichend dargestellt.

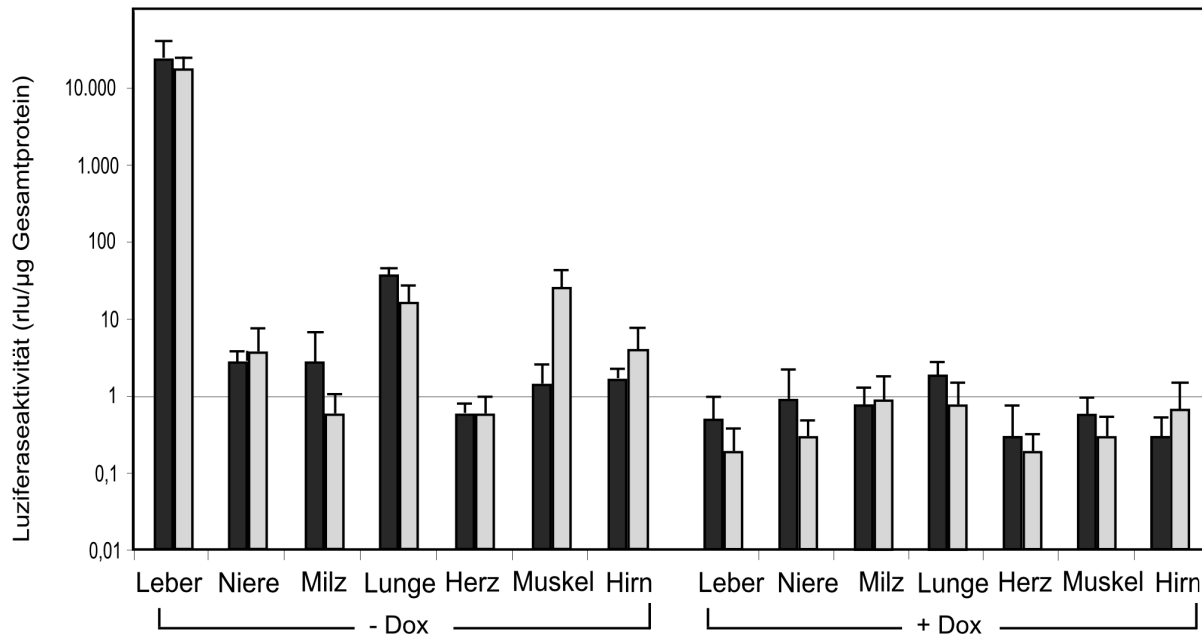


**Abb. 30: Luziferaseaktivitäten in Leberextrakten in Abhängigkeit von Doxyzyklin**

Gegenüberstellung der Luziferaseaktivität in Leberextrakten doppelt transgener Tiere der Linien TA<sup>LAP</sup>-2/E11-1 bis 6 und LC-1 in Abhängigkeit von Doxyzyklin. Die Werte sind den Abb. 6 bzw. Abb. 29 entnommen.

Daraus ist ersichtlich, dass zwei der E11-Linien (E11-2 E11-3) im aktivierten Zustand etwa das Expressions-Niveau von LC-1-Tieren erreichen, zwei Linien zeigen eine 3-5fach schwächere Aktivität (E11-1 und 5) und Linie E11-4 ist ca. dreimal stärker induziert als die LC-1 Linie.

Der direkte Vergleich zwischen der LC-1-Ausgangslinie und der E11-2-Linie ist in Abbildung 31 dargestellt.



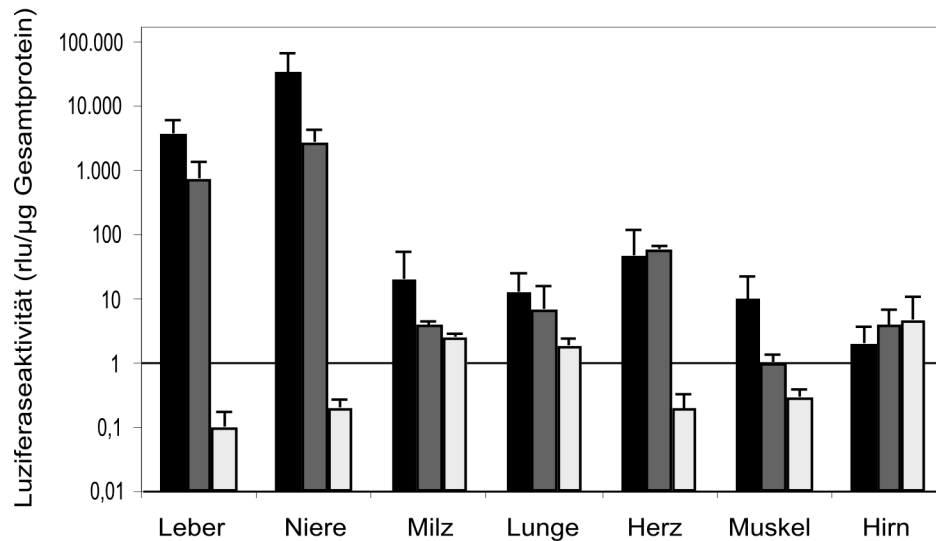
**Abb. 31: Direkter Vergleich der regulierten Luziferaseaktivität in verschiedenen Organen zwischen den Linien E11-2 und LC-1 nach Verpaarung mit TA<sup>LAP</sup>-2 Tieren**

Die Werte sind den Abbildungen 8 und 29 entnommen. Dunkle Balken: TA<sup>LAP</sup>-2/LC-1; helle Balken: TA<sup>LAP</sup>-2/E11-2

Hier wird deutlich, dass in der Linie E11-2 und LC-1 in allen Organen (unabhängig vom Induktions-Zustand) etwa gleich hohe Luziferaseaktivitäten erreicht werden.

Linie E11-1 zeigt nach Verpaarung mit TA<sup>LAP</sup>-2-Tieren niedrigere Luziferaseaktivitäten als die LC-1-Linie. Dies wurde durch die Kreuzung mit einer weiteren Transaktivatorlinie (rTA<sup>LAP</sup>-1) überprüft. Dazu wurden rTA<sup>LAP</sup>-1/E11-1-Mäuse eine Woche mit Dox getränkt (2mg/ml) bzw. mit Dox-freiem Trinkwasser gehalten, bevor man die Luziferase in Organextrakten bestimmte. Einen direkten Vergleich der Transgen-Expression von doppelt-transgenen Tieren (rTA<sup>LAP</sup>-1/LC-1 bzw. rTA<sup>LAP</sup>-1/E11-1) gibt Abb. 32.





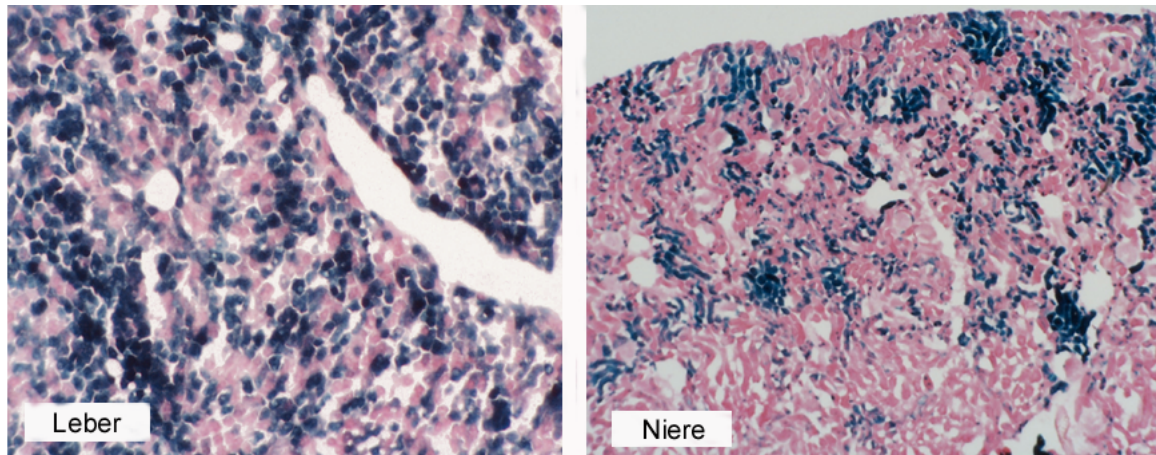
**Abb. 32 Vergleich der Luziferaseaktivität der Linien LC-1 und E11-1 nach Verpaarung mit  $rTA^{LAP-1}$ -Tieren**

Dargestellt ist die Luziferaseaktivität in Organextrakten doppelt transgener  $rTA^{LAP-1}/E11-1$ -Tiere in Abhängigkeit von Doxyzyklin. Die induzierten Tiere wurden eine Woche unter 2mg/ml Dox gehalten. Mittlere graue Balken: +Dox, n=3, helle Balken: -Dox, n=2. Zum Vergleich sind die Werte von induzierten  $rTA^{LAP-1}/LC-1$ -Tieren aufgetragen, die Werte sind aus Abb. 10 entnommen (schwarze Balken, n=6).

Auch dieses Resultat zeigt, dass E11-1-Tiere im Vergleich zur LC-1-Tieren nur eine 4-5fach niedrigere Induktionshöhe erreichen. Die organspezifische Verteilung der Transaktivator-induzierten Genexpression stimmt jedoch mit der LC-1-Linie sehr gut überein.

#### 5.3.2.5 Rekombinations-Induktion in der Leber und Niere von $E11-1/rTA^{LAP-1}/R26R$ Mäusen

Bei einer erfolgreichen Übertragung der Eigenschaften des LC-1-Locus sollte es mit den E11-Linien möglich sein, durch die Verpaarung mit  $rTA^{LAP-1}$ -Tieren in allen Hepatozyten eine Expression des *cre*-Gens zu erreichen. Um die Induktion der *luc/cre*-Transkriptionseinheiten der E11-Linien auf Einzel-Zellebene zu untersuchen, sollte die Cre-Aktivität histologisch nachgewiesen werden. Diese Experimente sind aufwändig, da triple transgene Tiere ( $rTA^{LAP-1}/R26R/E11$ ) gezüchtet werden müssen. Im Verlauf dieser Doktorarbeit konnte aus diesem Grund bisher nur Linie E11-1 analysiert werden (Abb. 33).



**Abb. 33: In situ-Analyse der Rekombinase-vermittelten lacZ-Expression in Organen von rTA<sup>LAP</sup>-1/E11-1/R26R Mäusen**

Zur Induktion der Cre-Rekombinase wurden triple transgene rTA<sup>LAP</sup>-1/E11-1/R26R-Mäuse mit 2mg/ml Dox für eine Woche gehalten. Zur Analyse wurden Leber und Nieren-Präparate (15-20µm Schnittdicke) mit X-Gal-Färbelösung über Nacht inkubiert, anschließend wurde mit Kernechtrot gegengefärbt.

Der Gewebeschnitt der Leber zeigt deutlich, dass nicht in allen Zellen ein Rekombinationsereignis stattgefunden hat. Offensichtlich wurde eine zur Rekombination des R26R-Locus ausreichende Menge an Cre-Rekombinase nur in etwa 60-70% der Hepatozyten induziert. In der Niere sind ebenfalls weniger Zellen gefärbt als in triple transgenen Mäusen, in denen die Cre-Rekombinase durch LC-1-Mäuse kontrolliert wird (vgl. Abb. 19), doch das Nieren-spezifische Expressionsmuster der rTA<sup>LAP</sup>-1-Linie findet sich auch hier wieder.

## 5.4 Sequenzanalyse des klonierten genomischen E11-Fragments

### 5.4.1.1 Suche nach Promotoren und codierenden Sequenzen

Zur Charakterisierung der DNA-Sequenzen des BAC E11 wurden der entsprechende endogene Bereich mit Sequenz-Analyseprogrammen untersucht. Dazu wurde das Computerprogramm „Eldorado“ der Firma Genomatix benutzt (<http://www.genomatix.de>), das die Identifikation von Promotoren (Werner, 1999; Scherf *et al.*, 2000) und von codierenden Sequenzen bzw. die Darstellung von Exon-Intron-Strukturen ermöglicht. Zusätzlich wurden die Gen-Voraussagen des Maus-Genom-Sequenzierungs-Konsortiums (Waterston *et al.*, 2002) integriert. Die Aufstellung der Ergebnisse ist im Anhang zu finden und wird hier zusammengefasst:

Am 5'-Ende der BAC-Sequenz (Position 5.480) ist eine 601 Bp lange Promotorsequenz lokalisiert. Dieser Promotor dient vermutlich zur Expression eines Gens, das große

Ähnlichkeit zur Serin/Threonin-Kinase 12 aus der Ratte besitzt [gi:23592392]. Die 432 Bp lange codierende Sequenz des Gens ist über 40.000 Bp verteilt, sie besteht aus drei kurzen Exons und zwei Introns (24370 und 15479 Bp lang). Das Gen liest in 5'-3'-Richtung und endet an Position 46.414. Im ersten Intron der Kinase befindet sich die LC-1-Transkriptionseinheit. In den restlichen 30 Kb in 3'-Richtung sind noch vier weitere Exons vorhanden. Diese gehören zu einem Gen, das wahrscheinlich für einen vomeronasalen Rezeptor der Maus codiert [gi:20822923]. Die 1218 Bp lange mRNA des Rezeptor-Gens liest gegen die Leserichtung der Kinase, d.h. in 3'-5'-Richtung zur BAC-Sequenz und endet an Position 50.011. Die Voraussage für den Promotor des Rezeptor-Gens lokalisiert diesen ca. 20.000 Bp weiter in 3' Richtung, also außerhalb der klonierten BAC E11-Sequenz. Beide Gene und ihre Promotoren sind experimentell nicht verifiziert, sodass es sich hier auch um Pseudogene handeln könnte. Das „ElDorado“ Programm gibt auch Auskünfte über potentielle „Scaffold bzw. matrix attachment regions“ (S/MAR) - d.h. DNA-Sequenzen, die eine Bindung der DNA an die Kernmatrix vermitteln („SMARTest“-Programm). Nach dieser Analyse werden an fünf verschiedenen Positionen des BAC E11 S/MARs gefunden. Die Struktur des E11-Locus ist in Abb. 35 schematisch dargestellt.

#### 5.4.1.2 Identifikation von „Matrix Attachment Regions“

Die Ergebnisse der transgenen E11-Linien zeigen, dass die statistische Integration des BAC E11 mit hoher Frequenz eine positionsunabhängige Regulation der Tet-kontrollierten Transkriptionseinheiten zulässt. In diesem Zusammenhang ist es interessant, welche genomischen Elemente für diese Eigenschaften des BACs verantwortlich sind. Bis heute sind vor allem zwei DNA-Elemente bekannt, die in höheren Zellen die Ausbildung von unabhängigen Sequenz-Bereichen vermitteln können: Isolator (oder „Boundary“)-Elemente und S/MARs.

„Boundary“-Elemente sind funktional definiert, sie verhindern die Interaktion zwischen Promotoren und Enhancern und schützen die Transgen-Expression vor PEV (Bell *et al.*, 2001). Es gibt jedoch noch keine Möglichkeit, diese Elemente durch Computer-unterstützte Analysen in genomischen Sequenzen nachzuweisen. Zur Identifikation von „Scaffold/Matrix-Attachment“-Regionen wurden verschiedene Algorithmen entwickelt (Frisch *et al.*, 2001, Singh *et al.*, 1997). S/MARs spielen eine Rolle bei der strukturellen Organisation von Chromatin-Domänen, da sie das Verankern der DNA an der Kernmatrix vermitteln und so für eine Abgrenzung von unterschiedlichen Chromatin-Domänen sorgen (Kalos *et al.*, 1995; Namciu *et al.*, 1998; Antes *et al.*, 2001). Die Programme zur Identifikation von Matrix-Bindungsstellen „SMARTest“ und „MAR-Wiz“ sind auf den Internetseiten [http://www.genomatix.de/cgi-bin/smartest\\_pd/smartest2.pl](http://www.genomatix.de/cgi-bin/smartest_pd/smartest2.pl) und <http://www.futuresoft.org/>

<modules/MarFinder/index.html> zu finden. In Abb. 34 ist die Analyse der BAC E11-Sequenz dargestellt. Dazu wurde das Programm „MAR-Wiz“ verwendet.

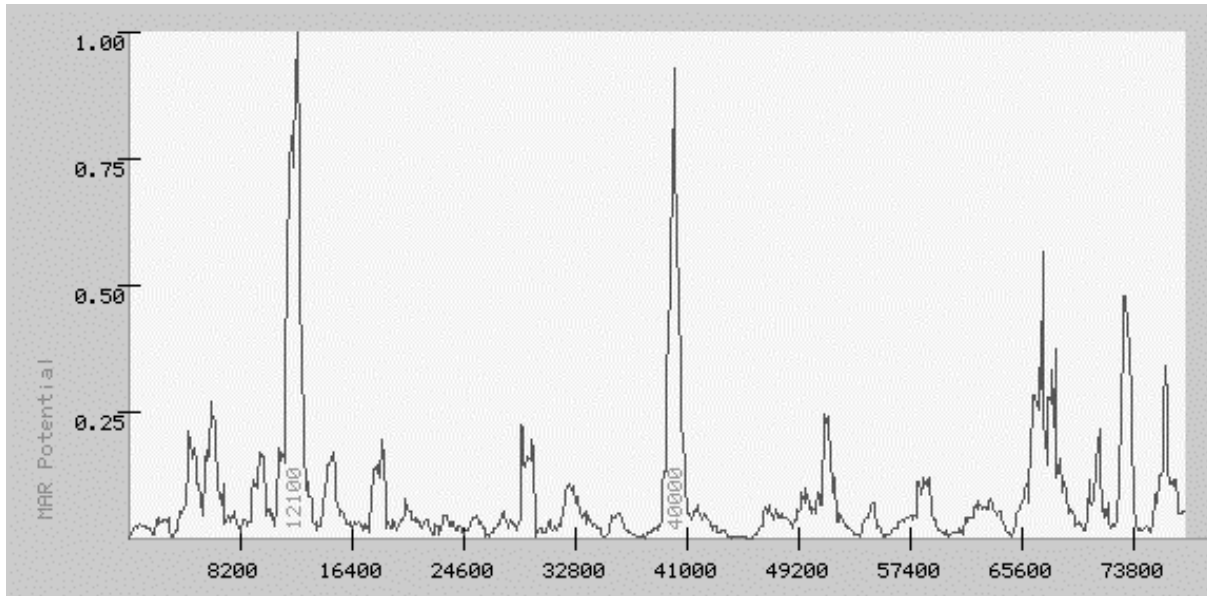
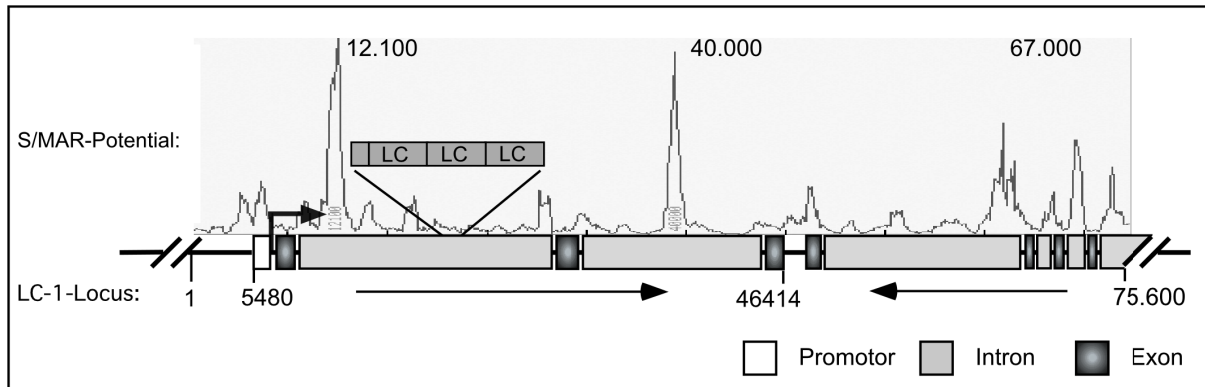


Abb. 34 S/MAR-Analyse der endogenen Locus-Sequenz durch das Programm „MAR-Wiz“

Die Voraussage für das Vorkommen von S/MARs basiert auf der Häufigkeit bestimmter Sequenz-Motive in einem untersuchten DNA-Bereich. Die verwendeten Motive sind bekannte Sequenzen, die mit S/MARs assoziiert sind. Das MAR-Potential einer Sequenz wird so normalisiert, dass die Werte zwischen 0 und 1 fallen. Werte über 0,6 geben eine hohe Wahrscheinlichkeit an, dass die analysierte Sequenz eine Chromatin-Bindungs-Domäne ist.

In der genomischen Sequenz, die durch den BAC E11 abgedeckt wird, werden durch die Computer-Analyse zwei deutliche Maxima an Position 12.100 und 40.000 identifiziert. Diese potentiellen S/MARs flankieren die Integrationsstelle des LC-1-Transgens. Eine weitere Region, um Position 67.000, liegt direkt am Schwellenwert von 0,6. Dies wird nochmals in der Abbildung 35 verdeutlicht. Die beiden signifikanten S/MAR-Potentiale stimmen auch mit der Analyse des „SMARTest“-Programms der Firma Genomatix überein (siehe Anhang). Hier werden noch S/MARs im Bereich um Position 5.500, 14.500 und 72.500 gefunden. An diesen Positionen kann das „MAR-Wiz“-Programm keine signifikanten S/MAR-Potentiale entdecken.



**Abb. 35 Schematische Darstellung des LC-1-Locus**

Zur Charakterisierung der mit BAC E11 isolierten DNA-Sequenzen wurde der entsprechende endogene Bereich mit dem Sequenz-Analyseprogramm „ElDorado“ untersucht. Dargestellt ist die Vorhersage der Exon-Intron-Strukturen im LC-1-Integrationslocus. Zum Vergleich ist das S/MAR-Potential der Sequenzen aus Abb. 34 in die Abbildung integriert.

## 6. Diskussion

### 6.1 Charakterisierung der Linie rTA<sup>LAP</sup>-1

Wie in der Einleitung beschrieben, ist unser Labor an der Tet-kontrollierten Genregulation in der Leber interessiert. Für viele Fragestellungen ist es hier von Vorteil, die Expression eines Fremdgens erst durch die Zugabe des Effektors aktivieren zu können. Aus diesem Grund war ein zentraler Punkt der vorliegenden Arbeit die Herstellung von Mauslinien mit rtTA-Aktivität in Hepatozyten.

Mit Hilfe des Transkriptionssignals P<sub>LAP</sub> konnten in unserem Labor vor einigen Jahren zwei Mauslinien hergestellt werden, die eine hepatozytenspezifische tTA-Expression besitzen (Mauslinien TA<sup>LAP</sup>-1 und TA<sup>LAP</sup>-2, Kistner *et al.*, 1996). Zur Etablierung der rtTA-Linie wurde deshalb ein Konstrukt verwendet (P<sub>LAP</sub>-rtTA2s-S2), das sich nur in den codierenden Sequenzen des Transaktivators von dem Transgen der TA<sup>LAP</sup>-Linien unterschied. Nach Mikroinjektion von P<sub>LAP</sub>-rtTA2s-S2-DNA wurden sieben DNA-positive Tiere identifiziert, von denen zwei Tiere nach Verpaarung mit wt-(C57Bl/6) und Reporterlinien ihr Transgen nicht weitergaben. Die verbleibenden fünf Linien wurden zunächst mit LC-1-Tieren gekreuzt, um die Luziferaseaktivität in doppelt transgenen Nachkommen vor und nach Dox-Induktion zu analysieren. Das Ergebnis dieser Analyse zeigte, dass nur in den Nachkommen einer Linie, rTA<sup>LAP</sup>-1, das Reportergen mittels Dox aktivierbar war. Dabei stellte sich auch heraus, dass die höchsten Luziferase-Werte in rTA<sup>LAP</sup>-1/LC-1-Tieren nicht in der Leber, sondern in der Niere erreicht wurden. Die Luziferaseaktivität in den restlichen Organen lag mehr als zwei Größenordnungen unter den Werten der Leber. Im nicht-aktivierten Zustand wurden in allen Organen Aktivitäten unter 1 rlu/μg gemessen, was etwa der Aktivität von einzeln transgenen LC-1-Tieren bzw. Tieren ohne Luziferase-Transgen entspricht. Diese niedrige Basalexpression demonstriert, dass die Anwesenheit von rtTA selbst zu keiner Erhöhung der Aktivität des Reportergens führt.

Die Mauslinien TA<sup>LAP</sup>-1 und TA<sup>LAP</sup>-2, die das gleiche Transkriptionssignal besitzen, zeigen in der Niere keine Expression. Die Aktivität der rTA<sup>LAP</sup>-1-Mäuse in der Niere wird also vermutlich durch einen Effekt des Integrationsortes auf die transkriptionelle Aktivität von P<sub>LAP</sub> ausgelöst. Talbot *et al.* (1994) beschreibt in der Original-Veröffentlichung des LAP-Promotors, dass die Gewebespezifität des Promotors nicht nur auf die Leber beschränkt ist, sondern dass in Abhängigkeit vom Konstrukt auch eine Expression im Gehirn, Niere, Herz, Milz und Lunge möglich ist. Auch in der TA<sup>LAP</sup>-1-Linie wird nicht nur in der Leber, sondern auch im Gehirn der Mäuse eine Aktivierung beobachtet (Kistner *et al.*, 1996).

Das Expressionsmuster der  $rtTA^{LAP}$ -1-Linie wurde mit doppelt transgenen Mäusen, die zusätzlich ein *lacZ*-Reporterkonstrukt tragen (Linie nZL-2), auf zellulärer Ebene in der Leber und in der Niere untersucht. In diesen Experimenten konnte in der Leber eine  $\beta$ -Gal-Induktion spezifisch in allen Hepatozyten nachgewiesen werden, die Zellen der Gefäßwände und des Bindegewebes blieben ungefärbt. Dies zeigt, dass in Hepatozyten die Expression des *rtTA2s-S2*-Gens keinem PEV unterliegt.

In der Niere ist die Aktivität ebenfalls auf spezifische Zelltypen beschränkt, eine Expression des *lacZ*-Gens findet sich hier hauptsächlich in der Nierenrinde. Die genaue Lokalisierung der *rtTA*-vermittelten Expression in der Niere war Gegenstand einer Zusammenarbeit mit Rachel Gallagher aus der Arbeitsgruppe Priv. Doz. Ralf Witzgall. Durch verschiedene Antikörper-Färbungen wurde so eine mosaikartige  $\beta$ -Gal-Ausprägung im corticalen Teil des proximalen Tubulus und im inneren Streifen der Niere, im TAL („thick ascending limb“)-Profil gefunden.

In weiteren Versuchen wurde in dieser Zusammenarbeit auch die Induktion der Luziferaseexpression in  $rtTA^{LAP}$ -1/LC-1-Tieren während der Entwicklung überprüft. In neugeborenen Tieren (Tag 1 nach der Geburt) ist die Luziferaseaktivität in der Niere wesentlich geringer als 35 Tage nach der Geburt bzw. in adulten Tieren. Zur Untersuchung der Rolle des PKD2 („polycystic kidney disease“)-Proteins bei der Auslösung des polyzystischen Nierenleidens wurden zusammen mit der Arbeitsgruppe Witzgall auch Mauslinien hergestellt, die humanes PKD2 und *lacZ* unter der Kontrolle von  $P_{tet}$ -bi tragen. Durch die Verpaarung mit  $rtTA^{LAP}$ -1-Tieren wurde das Experiment zur Induktion durch *rtTA* während der Entwicklung wiederholt. Die Analyse der  $\beta$ -Galaktosidase in Gewebeschnitten der neugeborenen Tiere bestätigte die quantitativen Luziferase-Daten (Gallagher *et al.*, zur Veröffentlichung eingereicht) und zeigte einen direkten Zusammenhang zwischen dem Differenzierungs-Status der Nierenzellen und dem Expressionsmuster des Transaktivators. Eine Blaufärbung findet sich nur in differenzierten Zellen. Der Unterschied der Induktionshöhe zwischen neugeborenen und erwachsenen  $rtTA^{LAP}$ -1/LC-1-Tieren kann damit erklärt werden, dass kurz nach der Geburt in der Niere noch weniger Zellen ausdifferenziert sind als zu einem späteren Zeitpunkt.

Durch die quantitative Untersuchung der Luziferaseaktivität während der Entwicklung wurde auch festgestellt, dass am Tag 7 und 14 postpartum die Expressionshöhe in allen untersuchten Organen im Vergleich zu neugeborenen Tieren reduziert ist. Nachdem die jungen Mäuse selbst anfangen, Doxyzyklin durch das Trinkwasser aufzunehmen (etwa im Alter von drei Wochen), wird die Expression wieder angeschaltet. So wurde am Tag 35 postpartum wieder eine hohe Luziferaseexpression gefunden. In der Literatur finden sich Hinweise, dass



Tetrazykline plazentagängig und auch in der Muttermilch zu finden sind (Hlavka & Boothe, 1985). Experimente mit dem tTA-System bestätigen dies, denn es wurde eine komplette Deaktivierung des Systems durch die Dox-Gabe im Trinkwasser der Mütter beschrieben (Lee *et al.*, 1998; Shin *et al.*, 1999; Fedorov *et al.*, 2001). Das tTA-System reagiert in Zellkulturexperimenten im Vergleich zu rtTA2s-S2 allerdings auf mehr als 500fach geringere Dox-Konzentrationen (Baron & Bujard, 2000). Aus diesen Daten ist zu entnehmen, dass Dox offensichtlich in ausreichenden Mengen zur Induktion des rtTA2s-S2-Transaktivators durch die Plazenta gelangt, vermutlich sind aber die Konzentrationen in der Muttermilch zu gering für eine effektive Induktion. Es bleibt abzuwarten, ob hier der Einsatz der Transaktivator-Variante rtTA2s-M2, die eine etwa 10fach höhere Sensitivität gegenüber Dox besitzt, eine Induktion des Systems zulässt.

Durch die Messung der Luziferaseaktivität in rTA<sup>LAP</sup>-1/LC-1-Tieren während der Entwicklung fiel weiterhin auf, dass die Expressionshöhe in Lebern neugeborener bzw. 35 Tage alter rTA<sup>LAP</sup>-1/LC-1-Tiere zehnfach höher war als in adulten Tieren. Die Ursache dieser Beobachtung ist zur Zeit nicht klar, da bislang noch nicht festgestellt wurde, dass der LAP-Promotor in jungen Tieren zu einer stärkeren Transkriptionsaktivierung in der Leber führt als in erwachsenen Mäusen. Eine Vermutung ist, dass die jungen Tiere im Vergleich zu adulten Tieren mehr Doxyzyklin (im Verhältnis zum Körpergewicht) aufnehmen, was zu einer stärkeren Aktivierung in der Leber führt. Teilweise können die Unterschiede auch damit erklärt werden, dass der Proteingehalt in den Organextrakten von jungen Mäusen niedriger ist als der von Lysaten adulter Mäuse. Die Organe von jungen Mäusen sind sehr klein und wurden deshalb sonifiziert, üblicherweise werden die Gewebelysate mit Hilfe eines Ultraturax homogenisiert. Die verschiedenen Methoden der Lysatherstellung könnten zu einem Unterschied in der Luziferaseaktivität führen.

Mit der rTA<sup>LAP</sup>-1-Linie wurden zum ersten Mal rtTA-Mäuse mit einer spezifischen Leber- bzw. Nierenaktivität geschaffen. Das beobachtete Expressionmuster des Transaktivators dieser Linie ist vielversprechend zur Untersuchung von Fragestellungen zu PEV oder der Induktionskinetik im Tet-System und zum Studium von Genfunktionen in der Leber bzw. der Niere. In zahlreichen Labors wird sie deshalb bereits zur konditionalen Expression von verschiedenen Zielgenen eingesetzt. In Zusammenarbeiten werden folgende Projekte bearbeitet:

- Herstellung einer Tet-regulierbaren Hepatitis C-Virus transgenen Maus als Hepatitis- und infektiöses Kleintiermodell (Evelyn Ernst und Dr. Jens Encke, Universität Heidelberg),



- In dieser Doktorarbeit wurden rTA<sup>LAP</sup>-1-Mäuse zur weiteren Charakterisierung der LC-1-Linie und zur Untersuchung der Induktionskinetik des reversen Systems eingesetzt.

Zu Beginn der Doktorarbeit waren schon einige Informationen über die besondere Qualität der LC-1-Linie vorhanden. Es war bekannt, dass sich die Luziferase im Pancreas von TA<sup>hCMV</sup>-5/LC-1-Tieren und in der Leber von TA<sup>LAP</sup>-1/LC-1 in Abhängigkeit von Dox effektiv regulieren ließ und dass eine dichte Kontrolle der Cre-vermittelten Rekombination in der Leber und in T-Zellen möglich war. Diese Vorgaben machten die LC-1-Linie zu einem Kandidat zur Isolierung und Klonierung eines S/A-Locus. Um diese Daten zu bestätigen, sollte die LC-1-Linie näher charakterisiert werden.

Ein erstes Experiment zeigte, dass in allen Organen von LC-1-Tieren die Luziferaseaktivität kaum über der experimentellen Nachweisgrenze bzw. im Bereich von wt-Mäusen lag. Zum Nachweis möglicher basaler Cre-Aktivität in LC-1-Mäusen wurden doppelt transgene LC-1/*R26R*-Tiere im Alter von 14 Monaten histologisch auf Blaufärbung von Zellen untersucht. Der Befund, dass bis zu diesem Zeitpunkt keine Aktivierung des Cre-Reporters nachzuweisen war, zeigt, dass in der LC-1-Linie weder während der Embryonalentwicklung noch in adulten Mäusen eine signifikante Expression der *luc/cre*-Expressionseinheit

stattfindet. Nur in wenigen Individuen wurden einzelne blaue Zellen in Gewebeschnitten der Niere und des Herzens gefunden. Der Grund für die Blaufärbung der Zellen können zwar seltene Rekombinationsereignisse in diesen Tieren sein, es ist aber auch nicht auszuschließen, dass eine endogene  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität beobachtet wurde. Diese Ergebnisse sind konsistent mit den Resultaten, die aus Untersuchung der L7-, nZL-2- oder tetDTA-Linie (Lee *et al.*, 1998) bekannt waren - in einem geeigneten genomischen Locus besitzen  $P_{tet}$ -Promotoren keine signifikante intrinsische Basalexpression.

Die Untersuchung des Regulationspotentials der LC-1-Linie wurde durch die Messung der Luziferaseaktivität in doppelt transgenen Tieren nach Kreuzung mit der Linie  $TA^{LAP-2}$  durchgeführt. Die Ergebnisse der  $TA^{LAP-2}/LC-1$ -Tiere bestätigen die ausgeprägte Leberspezifität der  $TA^{LAP-2}$ -Linie (Kistner *et al.*, 1996, Wang *et al.*, 2001). In diesen Experimenten konnte eine Regulation der Enzymaktivität in der Leber über mehr als vier Größenordnungen demonstriert werden. Die Basalexpression der doppelt transgenen Tiere im nicht-induzierten Zustand ist im Vergleich zu einzeln transgenen LC-1-Tieren nur in der Lunge geringfügig von 0,6 auf 1,9 rlu/ $\mu$ g erhöht, die restlichen Werte sind nicht von denen der LC-1-Linie zu unterscheiden. Die gleiche Regulationsspanne wurde in Kombination mit der  $rTA^{LAP-1}$ -Linie in der Niere und der Leber gefunden.

In Nachkommen aus Verpaarungen der LC-1-Linie mit weiteren Transaktivator-Linien, in denen tTA bzw. rtTA unter der Kontrolle von  $P_{CMV}$  und  $P_{CAMK}$  steht, konnte durch die nicht-invasive Methode zur Messung von Luziferaseaktivitäten festgestellt werden, dass in allen untersuchten Geweben das Reortergen hoch induzierbar war, bei kaum nachweisbarer Basalaktivität im nicht-induzierten Zustand.

Diese Daten bestätigen die Ergebnisse, die in Experimenten von Frieder Schwenk im Vorfeld erhalten wurden, vermutlich lässt sich die  $P_{tet}$ -bi-Transkriptionseinheit der LC-1-Linie in allen Zellen der Maus aktivieren. Vergleichbare Ergebnisse wurden in unserem Labor auch mit L7 und nZL-2-Tieren erzielt, auch diese Mauslinien lassen sich in allen analysierten Geweben aktivieren und besitzen eine kaum messbare Hintergrundexpression.

### 6.2.2 Nachweis der Koexpression von *luc* und *cre*

Die Möglichkeit, mit  $P_{tet}$ -bi in transgenen Mäusen zwei Gene gemeinsam durch einen Stimulus zu induzieren, ist für viele Fragestellungen interessant. Im Idealfall sind die beiden Gene quantitativ koexprimiert, sodass ein Gen als Reporter der transkriptionellen Aktivität des zweiten Gens eingesetzt werden kann. Um die Koexpression der *luc/cre*-Transkriptionseinheit in LC-1-Tieren zu untersuchen, wurden doppelt transgene  $rTA^{LAP-1}/LC-$

1-Tiere gezüchtet, die zur zeitlich definierten Transkriptions-Aktivierung 2mg Dox *i.p.* injiziert bekamen. Anschließend wurde die Menge der *luc* und *cre*-mRNA in der Leber zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen. In diesem Experiment konnte eine äquivalente Induktion der mRNA der beiden LC-1-Gene gezeigt werden, auch der Abbau der beiden mRNAs erfolgte etwa gleich schnell.

Die Koinduktion der zwei von P<sub>tet</sub>-bi kontrollierten Gene ist möglicherweise durch Positionseffekte nach genomischer Integration beeinflusst. So zeigt die Reporterlinie nZL-2 z.B. eine inhomogene Ausprägung der *luc/lacZ*-Transkriptionseinheit: Nach Induktion werden in diesen Tieren nur geringe Luziferase-Aktivitäten, aber eine hohe *lacZ*-Expression gefunden.

### **6.2.3 Untersuchungen zu PEV und der funktionalen Ausprägung der Cre-Rekombinase in der LC-1-Linie**

Die Expression eines Transgens unterliegt häufig PEV, was zu einer mosaikartigen Ausprägung im Gewebe führt. Auch die Aktivierung der LC-1-Transkriptionseinheit kann von solchen Positionseffekten beeinflusst sein, was die generelle Verwendung des Locus zur regulierten Genexpression einschränken würde.

Die Untersuchung dieser Eigenschaft wurde über die Aktivierung des *lacZ*-Gens im *R26R*-Locus als Nachweis einer funktionalen Ausprägung der Cre-Rekombinase durchgeführt. Zur Induktion der Rekombinase wurden LC-1-Tiere mit rTA<sup>LAP</sup>-1-Mäusen verpaart, da von dieser Linie bekannt war, dass sie in rTA<sup>LAP</sup>-1/nZL-2-Tieren eine Transkriptionsaktivierung in allen Hepatozyten vermittelt. In triple-transgenen rTA<sup>LAP</sup>-1/LC-1/*R26R*-Tieren konnte nach Dox-Induktion in Gewebeschnitten eine vollständige Rekombination in allen Hepatozyten erreicht werden, während sich in Kontrolltieren keine Rekombination nachweisen ließ. Diese Ergebnisse zeigen, dass der LC-1-Locus in der Leber keinen Positionseffekten unterliegt. Die Untersuchung der *cre*-Induktion in der Niere untermauert diese Ergebnisse, denn auch hier wurde in Abhängigkeit von Dox das gleiche *rtTA2-S2*-Expressionsmuster vorgefunden, das von rTA<sup>LAP</sup>-1/nZL-2-Tieren bekannt war.

Im Gegensatz zu diesen Resultaten konnte durch die immunologische Identifikation der Cre-Rekombinase in Gewebeschnitten von rTA<sup>LAP</sup>-1/LC-1-Tieren nicht in allen Hepatozyten ein Cre-Signal nachgewiesen werden. Dies kann mehrere Ursachen haben. Zum einen wird aufgrund des Kernlokalisierungssignals der Rekombinase das Protein im Zellkern konzentriert, nicht in allen Hepatozyten liegt der Zellkern in der Schnittebene der Gewebeproben, sodass hier möglicherweise keine Reaktion mit dem Antikörper stattfinden konnte. Zum anderen können unterschiedlichen Konzentrationen des Transaktivatorproteins

in den Zellen vorliegen, sodass bei der kurzen Induktion (den Mäusen wurden in diesem Experiment nur zwei Injektionen mit je 2 mg Dox verabreicht) nur in den Zellen mit hoher Transaktivator-Expression nachweisbare Mengen an Cre-Protein synthetisiert werden. Weiterhin können auch technische Schwierigkeiten aufgrund geringer Erfahrung des Experimentators bei der Immunperoxidase-Färbung von Gewebeschnitten der Grund für das beobachtete Expressionsmuster sein.

Eine erfolgreiche *cre*-Induktion in LC-1-Tieren ist auch mit weiteren Transaktivator-Linien möglich. Frieder Schwenk zeigte mit Hilfe von LC-1-Mäusen eine fast vollständige Rekombination eines *loxP*-flankierten DNA-Polymerase- $\beta$ -Allels in T-Lymphozyten (nach Verpaarung mit einer Lymphozyten-spezifischen tTA-Linie) und in der Leber (nach Verpaarung mit der TA<sup>LAP</sup>-1-Linie). Heinz Krestel (Arbeitsgruppe Prof. Seeburg) konnte eine effektive Induktion der Cre-Rekombinase im Gehirn von TA<sup>CamK</sup>-1/LC-1/R26R-Tieren nachweisen.

#### 6.2.4 Etablierung einer Methode zur *in vivo*-Darstellung von Reporterogenaktivitäten

In dieser Arbeit konnte durch die Etablierung der Biolumineszenz-Methode erstmals *in vivo* in Mäusen die Kontrolle der Genexpression durch das Tet-System verfolgt werden. Die Luziferase-Aktivität ist mit diesem System in inneren Organen (z.B. Leber oder Pancreas) und auch im Gehirn nachweisbar. Die Methode besitzt allerdings durch die Streuung der Photonen bei dem Austritt aus dem Gewebe eine geringe Auflösung, was z.T. die Identifikation der aktiven Organe erschwert. Einer *in vivo*-Analyse muss deshalb eine Lokalisierung des Expressionsmusters durch weitere Methoden folgen. Sind diese Daten vorhanden, kann die *in vivo*-Technik dazu eingesetzt werden, Langzeit-Induktionsexperimente zu verfolgen oder die Expressionsstärke von verschiedenen Individuen zu bestimmen. Auch bei der Etablierung von neuen Transaktivator- und P<sub>tet</sub>-kontrollierten Linien ist der *in vivo*-Nachweis hilfreich. Diese Technik ermöglicht eine funktionale Untersuchung doppelt transgener Tiere der F1-Generation im an- und abgeschalteten Zustand, ohne dass Tiere getötet werden müssen. Die so charakterisierten Tiere können direkt in Verpaarungen eingesetzt werden, was einen enormen Zeitvorteil bedeutet. In dieser Arbeit wurde mit der Biolumineszenz-Methode vor allem Untersuchungen zur Induktionskinetik durchgeführt. Ein entscheidender Parameter bei diesen Versuchen ist die Empfindlichkeit der Methode. Hier konnte *in vivo* in TA<sup>LAP</sup>-2/LC-1-Tieren noch ein Signal festgestellt werden, das in der Leber etwa 10 rlu/ $\mu$ g Gesamtprotein entspricht. Dies ist weniger als 0,1% der Aktivität im induzierten Zustand.

### 6.2.5 Kinetik der tTA- und rtTA-vermittelten Induktion in LC-1-Tieren

Mit TA<sup>LAP</sup>-2/LC-1-Tieren wurde der Zeitverlauf der Luziferase-Induktion *in vivo* bestimmt, nachdem die Mäuse für drei Tage unter 2µg/ml Dox im Trinkwasser gehalten wurden. Vom nicht-induzierten Zustand bis zur vollen Aktivierung werden sieben Tage benötigt. Wechselt man umgekehrt vom „An“- zum „Aus“-Zustand durch Beginn der Tränkung mit Doxyzyklin (2µg/ml), dauert es bei TA<sup>LAP</sup>-2/LC-1-Mäusen drei Tage, vermutlich kann diese Zeit durch die Gabe von höheren Konzentrationen abgekürzt werden. Dieser Zyklus, der insgesamt zehn Tage in Anspruch nimmt, ist beliebig wiederholbar.

Die Ergebnisse zeigen, dass Doxyzyklin-kontrollierte An- und Abschaltvorgänge in Mäusen reproduzierbar sind, d.h. mehrfach mit der gleichen Geschwindigkeit ablaufen ohne Verlust der Induktionshöhe. Werden höhere Doxyzyklin-Konzentrationen eingesetzt, verlangsamt sich der Induktions-Verlauf (A. Kistner, Dissertation Universität Heidelberg, 1996, Diamond *et al.*, 2000).

In rtTA<sup>LAP</sup>-1/LC-1-Tieren werden nach *i.p.*-Injektion von 2mg Dox in der Leber acht Stunden bis zur maximalen Induktion benötigt, während bereits 40 Stunden später das System wieder ausgeschaltet ist. Eine ähnlich schnelle Zyklus-Dauer nach einer einmaligen *i.p.*-Injektion von 500µg Doxyzyklin wurde auch für die Induktion von Chemokinen in Blutzellen beschrieben (Wiekowski *et al.*, 2001). Vergleicht man diese Daten mit der mRNA-Induktion (Abb. 11), so zeigt sich, dass das rtTA-System auf der Ebene der Transkription sehr schnell auf die unterschiedlichen Dox Konzentrationen reagiert. Schon 2,5 h nach *i.p.*-Injektion von 2mg Dox werden 70% der maximalen Transkriptionsrate erreicht, 24h nach Induktionsbeginn kann keine signifikante Transkription mehr nachgewiesen werden.

Das bedeutet zum einen, dass Doxyzyklin sehr schnell nach *i.p.*-Injektion in die Leber der Mäuse gelangt, aber auch schnell entfernt wird. Zum anderen bedeutet es, dass rtTA2s-S2 hohe Dox-Konzentrationen für eine Aktivierung benötigt. Die zweite Beobachtung wird durch einen quantitativen Vergleich der Luziferase-Werte nach *i.p.*-Injektionen mit der Induktion durch Trinkwasser gestützt. Durch die Injektionen wird für einen kurzen Zeitraum eine hohe Dox-Konzentration in der Leber erreicht, was zu einer Aktivierung bis 12.000 rlu/µg führt - durch das Trinkwasser werden nur 4000 rlu/µg erreicht.

Eine schnelle und effektive Aktivierung der Genexpression in LC-1-Tieren konnte auch durch die Induktion des *cre*-Gen in rtTA<sup>LAP</sup>-1/LC-1/R26R-Tieren gezeigt werden, hier war schon eine Dosis von 2 x 2mg Doxyzyklin innerhalb von 48 h für eine vollständige Rekombination in allen Hepatozyten ausreichend. Diese kurze, aber hohe Induktion des reversen Systems ist

ideal zur Ausprägung der Cre-Rekombinase, da so die Erkennung von kryptischen „Pseudo-*loxP*“-Sequenzen im Mausgenom vermieden werden kann.

Der Induktionsverlauf der Luziferase in der Leber weicht deutlich von der Induktion in der Niere ab. Durch die Bestimmung der Luziferasewerte nach *i.p.*-Injektion (Abb. 18) wurde festgestellt, dass in der Niere die Aktivierung des Reportergens wesentlich langsamer verläuft. In diesem Organ werden erst nach 8h die Luziferase-Aktivitäten erreicht, die in der Leber bereits 2,5h nach Dox-Injektion vorhanden sind. Ähnliche Ergebnisse wurden von Andreas Kistner in unserer Arbeitsgruppe in seinen Arbeiten zur Etablierung des Tet-Systems in Mäusen erhalten. In Versuchen mit  $rTA^{hCMV}/L7$ -Mäusen erreicht die Luziferaseaktivität 24h nach Induktion (durch orale Gabe von Dox) in sechs von sieben Organen (z.B. in der Niere) das maximale Niveau, die Luziferase-Aktivierung im Pankreas ist dagegen auch nach 24h noch nicht vollständig.

Aus diesen Ergebnissen ist zu entnehmen, dass die Kinetik der Regulation durch Doxyzyklin von Organ zu Organ unterschiedlich ist und aus diesem Grund individuell für das zu untersuchende Gewebe ermittelt werden muss. Die Geschwindigkeit der Dox-Aufnahme (und Ausscheidung) in der Leber scheint im Vergleich zu anderen Organen sehr schnell zu sein.

#### **6.2.6 Eignung der LC-1-Linie für die kontrollierte Cre-vermittelte Rekombination *in vivo***

Die dichte Kontrolle und die hohe Induzierbarkeit der Cre-Rekombinase in allen untersuchten Geweben machen die LC-1-Linie zu einem wertvollen und vielseitig einsetzbaren molekularbiologischen „Werkzeug“ zur kontrollierten gewebespezifischen Rekombination *in vivo*. Inzwischen existieren weit über 100 Mauslinien mit *loxP*-flankierten Zielgenen (Kwan, 2002), und mehr als 50 Linien, die eine gewebespezifische *tTA/rtTA*-Expression besitzen (Berger & Bujard, 2003). Durch die LC-1-Linie als Bindeglied können diese Mausfamilien kombiniert werden, was - mit einem gewissen Aufwand zur Kreuzung von triple transgenen Tieren - die Untersuchung von Genfunktionen über die Cre-vermittelte Rekombination ermöglicht, ohne die Notwendigkeit neue Mauslinien herzustellen.

In der Tat wird die LC-1-Linie bereits in mehreren Laboratorien zum kontrollierten „Knock-out“ von Genen zur Untersuchung von Genfunktionen eingesetzt.

### 6.3 Der genomische Integrationsort der LC-1-Linie - ein S/A-Locus?

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Regulationseigenschaften der LC-1-Linie „perfekt“ erscheinen:

- $P_{tet}$ -bi ist in LC-1-Tieren stringent kontrolliert, in keinem überprüften Gewebe wurde eine nennenswerte Basalexpression gefunden.
- Nach Verpaarung mit *tTA/rtTA*-exprimierenden Mäusen wird in allen untersuchten Geweben eine hohe Induktion gemessen.
- Die beiden Gene der LC-1-Linie werden äquivalent koexprimiert.
- Die Regulation der Genaktivität ist reproduzierbar über mehrere Größenordnungen möglich.
- Die Expression unterliegt, soweit es festgestellt werden konnte, keinen Positionseffekten.

Die hier beschriebenen Parameter machen die LC-1-Linie zu einem vielversprechenden Kandidaten zur Isolierung eines S/A-Locus. Nicht nur die funktionalen Eigenschaften von LC-1-Tieren waren ausschlaggebend für die Entscheidung, diesen Locus zu klonieren, sondern auch die Information, dass vermutlich nur zwei Kopien der *luc/cre*-Transkriptionskassette im LC-1-Locus integriert sind (DNA-Analyse durch Ronald Ullmann in unserem Labor mit Hilfe von „Southern-Blot“). Dadurch war es unwahrscheinlich, dass die Locus-Eigenschaften erst durch die Tandem-Integration multipler Kopien des Transgens zustande kamen.

### 6.4 Isolierung des LC-1 Locus als BAC

Die Herstellung einer BAC-Bibliothek mit LC-1-DNA wurde durch den Selektionsvorteil des in unserem Labor entwickelten Vektors pBeloBAC-HD erleichtert. Ein zweiter großer Vorteil war die Nutzung der Laboreinrichtungen und der Expertise des Deutschen Ressourcenzentrums für Genomforschung (RZPD) in Berlin. So konnten in kurzer Zeit vier unabhängige positive Klone aus 70.000 geprüften Kolonien identifiziert werden. Durch Sequenzierungen und Vergleiche von drei dieser Klone stellte sich heraus, dass diese einen identischen genomischen Bereich abdecken. Die Übereinstimmung zwischen den Klonen legt nahe, dass die klonierten Fragmente keine artifiziellen Konstrukte darstellen, die erst bei der Herstellung der BAC-Bank entstanden sind. Zur Feinanalyse durch Subklonierungen und weiteren Sequenzierungen wurde ausschließlich Klon BAC E11 verwendet, der ein 95 Kb-

großes DNA-Fragment enthält, in dem die bidirektionale *luc/cre*-Transkriptionseinheit dreimal in Tandem integriert ist. Sequenzvergleiche mit der Celera und ENSEMBL-Datenbank des Mausgenoms ergaben, dass sich die Integrationsstelle auf Chromosom 6 in der C1-Region befindet. Die Größenbestimmung der Klone durch PFGE und die theoretische Größe der BACs, die durch die Ergebnisse der Sequenzanalyse berechnet werden konnte, stimmen überein. Das bedeutet, dass es bei dem Integrationsprozess vermutlich zu keinen Deletionen von genomischen Sequenzen kam. Andererseits zeigt der Vergleich der E11-Sequenzen mit der wt-Sequenz aus der ENSEMBL-Bank, dass ein Rearrangement eines 2-3 Kb langen DNA-Fragmentes vorliegt. Ob dieser Unterschied nach zukünftigen Annotierungen des Mausgenoms bestehen bleibt, wird sich zeigen.

#### **6.4.1 Analyse des BAC E11-Fragments im genomischen Kontext**

##### **6.4.1.1 Herstellung von stabilen Hela-Zellklonen**

Vor der Herstellung von transgenen Mäusen mit den BAC-Fragmenten sollte durch Transfektionsexperimente in HtTA-Zellen festgestellt werden, ob die klonierten Sequenzen funktionale Expressionseinheiten besitzen und ob die klonierten BAC-Fragmente in der Lage sind, die Eigenschaften des LC-1-Locus zu übertragen.

Die transienten Transfektionen bestätigten zunächst die Funktionalität: Mit allen BACs war eine Dox-abhängige Regulation der Luziferase möglich. Durch weitere Transfektionen wurden stabile Hela-Zellklone mit dem F24 und E11-Fragment hergestellt. In diesen Experimenten vermittelten beide BACs eine hohe Anzahl an Hygromycin-resistenten Klonen (30-70%), deren Luziferase-Aktivität über mehrere Größenordnungen regulierbar war - im Gegensatz zu nur etwa 5%, die bei entsprechender Transfektion mit Plasmid-DNA beobachtet werden. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass die Eigenschaften des LC-1-Locus durch große DNA-Fragmente übertragen werden können.

Ein nicht erwartetes Ergebnis soll hier nicht verschwiegen werden: Nach ein paar Wochen in Kultur nahm das Regulationspotential der meisten Klone deutlich ab. Die Ursache hierfür könnte z.B. in der Methode der Herstellung der stabilen Klone liegen. Sie wurden durch eine Kotransfektion mit einem Resistenzplasmid gewonnen, sodass sich bei der Etablierung der Klone in einer Zellpopulation möglicherweise auch resistente Zellen befunden haben, die keine Luziferase-Expressionskassette tragen (in diesen Experimenten wurde initial keine Vereinzelung von Zellen einer Population vorgenommen). Falls diese resistenten Zellen einen Wachstumsvorteil besitzen, nimmt die Luziferaseaktivität mit der Zeit immer mehr ab. Eine weitere Erklärung wäre, dass die Integration großer Maus-DNA-Fragmente in Hela-Zellen



nicht stabil ist oder dass epigenetische Mechanismen für die Abnahme der Luziferaseaktivität verantwortlich sind.

#### **6.4.1.2 Herstellung von transgenen Mäusen mit dem E11-BAC**

Aufgrund der positiven Ergebnisse der stabilen Hela-Zellklone wurde das 95 Kb-Fragment des BAC E11 eingesetzt, um durch DNA-Injektion in den Pronukleus befruchteter Eizellen transgene Mauslinien zu etablieren. Von den geborenen Tieren waren 30% DNA-positiv für das Cre bzw. Luziferase-Gen. Da normalerweise eine Ausbeute von 10-20% positiver Tiere beobachtet wird (Frank Zimmermann, persönliche Mitteilung) zeigt dieses Resultat, dass die flankierenden genomischen Sequenzen keine negative Auswirkung auf die Effizienz der Integration besitzen. Insgesamt wurden zehn transgene Stammtiere gewonnen, von denen sieben das intakte Fragment integriert enthielten.

Zur Etablierung der E11-Linien wurden nur die Stammtiere mit vollständigem BAC-Fragment verwendet. Mit Ausnahme einer Maus gaben alle Tiere ihr Transgen an die Nachkommen der F1-Generation weiter, was zu den Linien E11-1 bis 6 führte. Zur Bestimmung des Regulationspotentials der E11-Linien wurden die Linien E11-1 bis 6 mit TA<sup>LAP</sup>-2-Tieren verpaart, eine Doxyzyklin-kontrollierbare Expression wurde daher nur in der Leber der doppelt transgenen TA<sup>LAP</sup>-2/E11-Tiere erwartet.

Alle E11-Linien zeigten initial eine hohe Luziferase-Induktion in der Leber und nur minimale Basalaktivität im nicht-induzierten Zustand. Die Überprüfung der Luziferaseaktivität in mehreren Generation ergab, dass eine Linie (E11-6) kein stabiles Expressionsmuster besaß. Die Ursache für diese Beobachtung wurde nicht analysiert. Auf eine weitere Diskussion dieser Linie wird deshalb verzichtet.

Von den verbliebenen fünf E11-Linien besaßen drei Mausstämme (E11-1, E11-2 und E11-5) nach Verpaarung mit tTA-Mäusen ein mit TA<sup>LAP</sup>-2/LC-1-Tieren identisches Muster der Genexpression. In diesen Linien wird in der Leber das Luziferase-Gen mindestens 500fach stärker aktiviert als in den restlichen Organen. Durch die Verpaarung von E11-1-Tieren mit rTA<sup>LAP</sup>-1-Mäusen wurde ebenfalls ein der LC-1-Linie vergleichbares Expressionsmuster gefunden. Die Tiere der restlichen Linien (E11-3 und E11-4) zeigen ein Expressionsprofil, das sehr ähnlich mit dem der LC-1 Linie ist, zusätzlich wurde hier aber noch eine Expression im Muskel festgestellt. Eine solche Aktivität wurde bislang in verschiedenen Verpaarungen mit TA<sup>LAP</sup>-2-Tieren noch nicht beobachtet (Kistner *et al.*, 1996; Lavon *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001). Trotz der Muskelexpression ist allerdings die Leberspezifität auch in diesen Linien ausgeprägt, denn die Luziferaseaktivität beträgt in beiden Linien nur etwa ein Zehntel der

Leberwerte (E11-3: 2000 rlu/ $\mu$ g, E11-4: 5500 rlu/ $\mu$ g). Wird berücksichtigt, dass im Muskel weit weniger lösliches Protein in Gewebeextrakten vorliegt, so ergibt sich, dass die Muskelexpression zwar signifikant ist, aber im Vergleich zur Leber relativ schwach ausfällt. Über die Ursache der Muskelaktivität lässt sich momentan nur spekulieren. Vermutlich besitzt der LAP-Promotor in den meisten Geweben eine geringe Aktivität. Die dadurch erzeugte intrazelluläre Konzentration an Transaktivator führt je nach Zugänglichkeit von  $P_{tet}$  zu einer Expression des Luziferase-Gens.

Vier der E11-Linien zeigen nach Verpaarung mit  $TA^{LAP-2}$ -Mäusen im nicht induzierten Zustand in allen analysierten Organen eine niedrige Basalaktivität, die nicht von  $TA^{LAP-2}/LC-1$ -Tieren zu unterscheiden ist und im Bereich von 1 rlu/ $\mu$ g oder weniger liegt. Nur in Linie E11-4 - die Linie mit der höchsten Aktivität nach Induktion - wird in allen Organen im nicht-induzierten Zustand eine leicht erhöhte Hintergrundaktivität gemessen.

Im induzierten Zustand wird die *luc*-Expressionshöhe der LC-1-Linie in der Leber von zwei Linien erreicht und von einer Linie deutlich überschritten. Eine interessante Beobachtung ist in diesem Zusammenhang, dass der Durchschnitt der induzierten Luziferaseaktivität in der Leber aller E11-Linien ( $\approx 21.000$  rlu/ $\mu$ g) fast identisch ist mit dem  $TA^{LAP-2}/LC-1$ -Niveau ( $\approx 24.000$  rlu/ $\mu$ g).

Normalerweise ist die Herstellung von funktionalen Mauslinien nur in maximal 5-10% der Stammtiere erfolgreich. Durch die Verwendung des E11-BACs konnten in fünf aus sieben Stammtieren, die zur Verpaarung eingesetzt wurden, eine Luziferase-Regulation in Abhängigkeit von Dox über vier Größenordnungen gemessen werden. Dabei ist zu berücksichtigen, dass zwei weitere Stammtiere, deren Fibroblasten in Transfektions-Experimenten sehr gute Regulationseigenschaften zeigten, hier nicht zur Etablierung von Linien verwendet wurden. In diesen Mäusen wurde zwar eine Deletion an einem oder beiden Enden des E11-Fragments gefunden, dies muss jedoch nicht notwendigerweise die Eigenschaften des BACs verändern.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die isolierten genomischen Sequenzen des BAC E11 die Fähigkeit besitzen, die Regulationseigenschaften der LC-1-Linie durch DNA-Transfer effizient in andere genomische Loci zu übertragen. Durch die Mikroinjektion des E11-Fragments konnte eine Linie gewonnen werden, die mit der LC-1-Linie im Prinzip identisch ist, vier weitere Linien besitzen sehr ähnlich Regulationseigenschaften.

Trotz der Isolierung der *luc/cre*-Transkriptionseinheit im BAC-Fragment wird die Expression in den E11-Mauslinien in einem gewissen Rahmen noch von der Sequenzumgebung des

Integrationsortes beeinflusst. So finden sich bis zu zehnfache quantitative Unterschiede zwischen den LC-1-Linien „der zweiten Generation“. Dies kann zwar auch an der Kopienanzahl der integrierten Fragmente liegen, in einer ersten „Southern“-Analyse konnte dies aber nicht bestätigt werden. Für einen Einfluss durch umliegende Sequenzen spricht auch die Muskelaktivität der Linien E11-3/E11-4 und die Aktivität der E11-4-Linie. Nach Induktion werden in TA<sup>LAP</sup>-2/E11-4-Tieren in der Leber 2-3fach höhere Luziferase-Werte gemessen als in Organextrakten von TA<sup>LAP</sup>-2/LC-1-Tieren. Diese Linie wurde inzwischen auch mit Mäusen verpaart, die eine hirnspezifische Expression des *rtTA2<sup>s</sup>-M2*-Gens besitzen. In doppelt transgenen Nachkommen konnte im direkten Vergleich mit der LC-1 Linie im Gehirn eine bis zu zehnfach höhere (Doxyzyklin-abhängige) Induktion der Luziferase nachgewiesen werden. Die Induktion des rtTA-Systems im Gehirn ist durch die schlechte Penetration von Doxyzyklin durch die Blut-Hirn-Schranke limitiert, was zu einer nur schwachen Aktivierung der P<sub>tet</sub>-kontrollierten Gene führt. In diesem Zusammenhang ist der Einsatz der E11-4-Linie zur induzierbaren Rekombination vorteilhaft. Experimente zur Identifikation einer möglichen unregulierten Rekombinaseaktivität und zur *cre*-Expression nach Induktion werden mit dieser Linie zur Zeit durchgeführt.

#### 6.4.2 Der E11-Locus

Durch eine Computeranalyse der klonierten BAC-Sequenz wurde in den ersten 46 Kb des BACs ein potentiell offenes Leseraster für eine Serin/Threonin-Kinase mit Promotor-Region am 5'-Ende gefunden, im ersten Intron des Gens ist das Transgen der LC-1-Linie integriert. Am 3'-Ende - in gegenläufiger Leserichtung zu der codierenden Sequenz der Kinase - ist ein Teil eines Gens lokalisiert, das vermutlich für einen vomeronasalen Rezeptor (V1Rc10) codiert. Ob es sich bei diesen Sequenzen tatsächlich um exprimierte Gene handelt, ist nicht bekannt. Durch die Integration der *luc/cre*-Kassetten wird in der LC-1-Linie vermutlich die Transkription des Kinase-Gens verhindert, denn zu beiden Seiten des Konstrukts sind Polyadenylierungssignale eingefügt, die zu einem Abbruch der Transkription führen würden. Da LC-1-Tiere ohne Probleme homozygot gezüchtet werden können, ist anzunehmen, dass es sich hier entweder um ein Pseudogen handelt oder die Funktion des Gens durch kompensatorische Mechanismen von anderen Enzymen übernommen werden kann. Dafür spricht, dass in der InterPro-Datenbank 3228 Proteine mit der gleichen katalytischen Serin/Threonin-Kinase-Domäne aufgeführt sind (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/Entry?ac=IPR002290>). Auch das zweite Gen in der klonierten E11-Sequenz gehört zu einer sehr großen Proteinfamilie, es wurden bislang 137 Gene der V1r-Rezeptorfamilie beschrieben (Rodriguez *et al.*, 2002).

Bei der Verwendung von großen genomischen Sequenzen zur Expression eines Transgens macht man sich die Eigenschaft zunutze, dass DNA-Sequenzen einer bestimmten Größe reproduzierbar eine lokale Chromatinstruktur an der Integrationsstelle ausbilden. Das Fragment formt so eine eigene Domäne mit unabhängigen Eigenschaften. Die Informationen, wie diese Domäne strukturiert ist, muss also in der Sequenz selbst vorliegen. Das gleiche Prinzip konnte auch durch BAC E11 gezeigt werden. Die Vorstellung, dass Chromatin-Domänen bei der transkriptionellen Regulation eine wichtige Rolle spielen und einer Promotor-Suppression entgegengewirken können (Villemure *et al.*, 2001), waren der Anlass, in den genomischen Sequenzen des E11-BACs nach S/MAR-Elemente zu suchen. Diese Sequenz-Elemente vermitteln die Bindung von Chromatin-Schleifen an die Kernmatrix wodurch diskrete Domänen mit einer eigenen höheren Ordnung entstehen (Berezney & Wie, 1998). Durch Computer-unterstützte Analyseprogramme wurden mindestens zwei S/MAR-Elemente in den Introns des Kinase-Gens identifiziert. Eine weitere S/MAR-Region liegt vermutlich am 3'-Ende des BACs. Durch diese Anordnung scheint die LC-1-Integrationsstelle von beiden Seiten von Kernmatrix-bindenden Sequenzen flankiert zu sein.

Ob S/MAR-Elemente in der Lage sind, Expressionskassetten vor Chromatin-Einflüssen zu schützen, ist in der Literatur umstritten. Eine solche Funktion ist bislang vor allem für Isolator-Sequenzen beschrieben. Diese wurden ursprünglich in *Drosophila* durch zwei Eigenschaften charakterisiert: Sie beeinflussen die Interaktion zwischen Enhancer und Promotor, wenn sie zwischen den beiden Sequenzen lokalisiert sind, und sie schützen Transgene vor Positionseffekten im Chromatin. Man findet Isolatoren aber vor allem im Grenzbereich zwischen reprimierten und aktiven Bereichen der DNA (Gerasimova & Corces, 2001), sie sind hier vermutlich auch an der strukturellen Organisation der DNA innerhalb des Nukleus beteiligt (Burgess-Beusse *et al.*, 2002). Der genaue Mechanismus, wie Isolator-Elemente codierende Sequenzen vor chromosomalen Positionseffekten bzw. unspezifischer Aktivierung oder Repression schützen, ist bislang noch wenig verstanden. Es wird aber vermutet, dass dies über die Interaktion mit der Kernmatrix erfolgen könnte (Gerasimova & Corces, 1998). Aus diesem Grund liegt es nahe, dass auch S/MAR-Elemente direkt einen Einfluss auf die Organisation der Chromatin-Struktur in funktionelle Domänen, und damit auf die Genexpression haben können (Geyer, 1997). Eine Trennung der Aufgaben von Isolator und S/MAR-Elemente ist schwierig, denn es wurde gezeigt, dass einzelne S/MAR-Sequenzen ebenfalls Promotoren vor PEV schützen können (Stief *et al.*, 1989; Namciu, *et al.*, 1998) und manche Isolator-Sequenzen eine Bindung von DNA-Bereichen an die Kernmatrix verursachen (Nabirochkin *et al.*, 1998, Antes *et al.*, 2001).

Die S/MAR-Elemente im Bereich der in E11 klonierten DNA könnten also für eine Abgrenzung der beiden (potentiellen) Gene im LC-1-Locus mit verantwortlich sein. Am 5'-Ende der E11-Sequenz beginnt die codierende Region der Serin/Threonin-Kinase. Falls es sich hier um ein Enzym handelt, das im normalen Metabolismus der Zelle aktiv ist, muss eine offene Chromatindomäne vorliegen, die eine ubiquitäre Transkription zulässt. In direkter Nähe befindet sich aber das Gen des vomeronasalen Rezeptors. Als Teil des olfaktorischen Systems sind diese Rezeptoren von Pheromonen selektiv nur in den sensorischen Neuronen des vomeronasalen Organs (VNO) vorhanden (Del Punta *et al.*, 2002). Ein einzelnes Neuron exprimiert wahrscheinlich nur ein Rezeptorgen aus zwei Superfamilien mit mehreren hundert Genen (Rodriguez *et al.*, 2002). Dies bedeutet, dass das Rezeptor-Gen vor unspezifischer Aktivierung geschützt werden muss.

Die Eigenschaften des E11-BACs können dadurch erklärt werden, dass die S/MAR-Sequenzen (und weitere regulatorische Elemente?) einerseits für eine generelle Zugänglichkeit des LC-1-Locus, d.h. für eine offene Chromatinstruktur sorgen, andererseits für die Ausbildung von zwei diskreten regulatorischen Domänen verantwortlich sind. Dadurch ist die LC-1-Integrationsstelle vor unspezifischer Aktivierung geschützt, aber in allen Zellen aktivierbar. In diesem Modell wird vorausgesetzt, dass bereits die erste S/MAR-Sequenz (die das höchste „MAR-Potential“ besitzt, siehe Abb. 34 und 35) in 5'-Richtung der *luc/cre*-Transkriptionseinheit eine direkte Aktivierung durch den Kinase-Promotor verhindert.

Zu dieser Vorstellung passt das Modell zur Funktion des *gypsy*-Isolators bei der Transkriptionsregulation in *Drosophila*. Ein Enhancer kann die Transkription eines Genes nur dann aktivieren, wenn sie beide in der gleichen, durch Isolatoren (und S/MAR-Sequenzen?) definierten Domäne lokalisiert sind. Die Sequenzen verhindern gleichzeitig das Ausbreiten von repressiven Chromatin-Strukturen, erlauben so die Etablierung einer offenen Chromatin-Konformation und damit eine effektive spezifische Transkription der Gene (Gerasimova & Corces, 2001).

## 6.5 Ausblick

Durch die Klonierung des LC-1-Locus wurde eine genomische Stelle identifiziert, die sich vermutlich generell zur Expression von Tet-regulierten Zielgenen eignet. Mit der Methodik der homologen Rekombination in ES-Zellen sollte es möglich sein, diesen Locus anzusteuern und dort gezielt DNA-Fragmente einzusetzen. Dadurch wäre man nicht auf die zufällige Integration der Expressionseinheiten in einen S/A-Locus angewiesen, und die Etablierung von funktionalen Mauslinien wäre vorhersagbar - zusätzlich sind die Ergebnisse aus Versuchen mit solchen Mäusen direkt miteinander vergleichbar. Dieser Ansatz wird zur Zeit in einer

Zusammenarbeit mit Prof. Dusan Bartsch (Zentralinstitut für Seelische Gesundheit, Mannheim) und Prof. Austin Smith (Universität Edinburgh) verfolgt.

Eine genomische Integrationsstelle, in der Transkriptionseinheiten vor Chromatineinflüssen weitgehend geschützt sind, die aber in allen Geweben eine hohe Expression erlaubt, ist zur Etablierung von transgenen Mäusen von allgemeinem Interesse. Auch zur konstitutiven Expression eines Transgens (z.B. zur gewebespezifischen Ausprägung von tTA oder rtTA) könnte sich der Locus eignen.

Die von uns entwickelte Technik erlaubt die schnelle Identifikation und Klonierung von genomischen Integrationsstellen, sodass leicht weitere genomische Loci mit besonderen Eigenschaften gefunden werden können. Ein interessanter genomischer Locus wäre z.B. auch die Integrationsstelle der tet-DTA-Linie (Lee *et al.*, 1998). Das gezielte Ansteuern dieses Locus bzw. ein entsprechender BAC sollte die Herstellung von transgenen Linien zur Tet-kontrollierten Expression von toxischen Genen erleichtern. Es ist vorstellbar, für bestimmte Chromosomen auch mehrere Integrationsstellen zu finden, was die gleichzeitige Kontrolle von verschiedenen Genen oder die Kombination von Transaktivator- und  $P_{tet}$ -kontrollierten Transkriptionseinheiten erlauben würde. Bei Kreuzungen mit Transaktivator-Mäusen würden diese Loci nicht segregieren, was die Züchtung der Mäuse vereinfacht. Zur ubiquitären Ausprägung von tTA/rtTA könnte in einem solchen Experiment z.B. der ROSA-Locus angesteuert werden, der auch auf Chromosom 6 liegt.

Ohne Frage wird es in Zukunft auch für Menschen die Möglichkeit zur somatischen Gentherapie geben. Viele Forscher wollen hier sinnvollerweise nur eine kontrollierte Expressionseinheit des therapeutischen Gens einsetzen, da diese bei Nebenwirkungen „abgeschaltet“ werden kann. Auch die Anwendung des Tet-Systems wird in diesem Zusammenhang diskutiert, denn Tetrazykline sind pharmakologisch sehr gut charakterisiert und werden routinemäßig in Menschen als Antibiotika eingesetzt. Bei einer solchen Therapie ist die reproduzierbare Ausprägung des humanen „Transgens“ besonders wichtig. Auch hier könnte die von mir benutzte Strategie einen entscheidenden Vorteil bringen. Über die Identifizierung eines S/A-Locus in humanen Zellen könnten Stammzellen in Zellkultur gezielt mit Tet-regulierten Konstrukten ausgestattet werden, bevor sie wieder zurück in Patienten transferiert werden.

Durch die Experimente dieser Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass es mit Hilfe der BAC-Technologie möglich ist, die Eigenschaften eines Tet-regulierbaren Locus mit hoher Effizienz auf andere Mauslinien zu übertragen und damit die Etablierung von  $P_{tet}$ -kontrollierten Linien durch Mikroinjektion wesentlich zu vereinfachen.

Ein wichtiger Schritt für eine generelle Anwendung der BAC-Strategie ist der Austausch der drei in Tandem integrierten *luc/cre*-Kassetten des BAC E11 gegen neue Tet-regulierte Zielgene. Es ist anzunehmen, dass die daraus resultierenden Konstrukte ebenfalls die beschriebenen Eigenschaften des BAC E11 besitzen, da die flankierenden genomischen Sequenzen erhalten bleiben.

Die Anwendung des Tet-Systems in transgenen Mäusen erfordert einen hohen experimentellen Aufwand, da in der Regel zwei funktionale Linien (Transaktivator- und Zielgen-Linie) hergestellt werden müssen. Die schnell wachsende Zahl an Transaktivator-Stämmen sollte im Prinzip in einiger Zeit eine Tet-kontrollierte Gen-Regulation in fast allen Geweben ermöglichen. Die Zugänglichkeit zu diesen Linien ist allerdings oft beschränkt, sodass die Etablierung von eigenen Linien oft die einzige Alternative ist. Der Keimbahn-Transfer der beiden Komponenten des Tet-Systems in einem Schritt wäre in diesem Zusammenhang ein Vorteil. Die Nachteile von Ein-Plasmid-Konstrukten bzw. von Kointegrationen von Transaktivator-Konstrukten und  $P_{tet}$  wurden im Verlauf dieser Arbeit bereits diskutiert. Das größte Problem ist hier die gegenseitige Beeinflussung der Transkriptionseinheiten, die zu einer Reduktion der Expression beider Einheiten führen kann (Eszterhas *et al.*, 2001). Durch den Einsatz des E11-Fragmentes könnten diese Wechselwirkungen unterbunden werden.

Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, ist das Luziferase-Konstrukt im E11-Fragment in fünf unabhängigen Integrationsorten der E11-Linien vor zufälliger Enhancer-Aktivierung geschützt, gleichzeitig ist in allen Linien nach Transaktivator-Bindung eine hohe Expression induzierbar. Wie bereits an anderer Stelle erwähnt, sind vermutlich in der BAC-Sequenz Kontrollelemente enthalten, die im endogenen Locus die Interaktion von regulatorischen Elementen des Kinase-Gens mit dem V1Rc10-Gen (und umgekehrt) verhindern. So ist es möglich, dass auch ein tTA/rtTA-Konstrukt, das z.B. am 3'-Ende in das letzte Intron des Rezeptor-Gens eingesetzt wird, keinen Einfluss auf die  $P_{tet}$ -kontrollierten Transkriptionseinheiten hat. Dadurch könnte ein Vektor geschaffen werden, der beide Tet-Komponenten trägt, aber nicht die beschriebenen Nachteile mit sich bringt. Alternativ könnte der Austausch des Kinase-Promotors mit einer Transaktivator-Transkriptionseinheit zu einem funktionalen Konstrukt führen. Diese Strategie kann leicht mit Hilfe des E11-BACs getestet werden, indem zusätzlich eine Transaktivatoreinheit integriert wird. Hierdurch könnte ein möglicher Einfluss auf die Basalaktivität der Luziferase z.B. in stabilen Klonen gemessen werden.

In diesem Zusammenhang ist es von Interesse, welche DNA-Sequenzen im E11-BAC für die in dieser Arbeit beschriebenen Eigenschaften verantwortlich sind. So könnten z.B. die identifizierten S/MARs in „Positions-Effekt-Assays“ eingesetzt werden (Kellum & Schedl, 1991), wodurch eine Isolator-Funktion überprüft werden kann. Falls es so möglich ist, funktionale Elemente im E11-BAC zu lokalisieren, ist die Konstruktion von „Mini-BACs“ oder Plasmiden mit S/A-Potential denkbar.

Eine weitere Möglichkeit, die Etablierung eines Tet-regulierten Mausmodells zu beschleunigen, ist die Kointegration von zwei BAC-Konstrukten. Die verlässliche Transaktivator-Synthese durch Kontrollelemente, die in großen DNA-Fragmenten enthalten sind, wurde bereits gezeigt (Perea *et al.*, 2001). Mischt man DNA-Fragmente gleicher Größe in stöchiometrischen Mengen, kommt es nach Mikroinjektion in befruchtete Oozyten häufig zur Integration beider Fragmente in einen Locus. Durch die Kombination eines E11-Konstrukts mit großen DNA-Fragmenten zur Ausprägung von tTA/rtTA sollte eine direkte Wechselwirkung der Transkriptionseinheiten verhindert sein. Bei Erfolg sollte diese Methode den Zeit- und experimentellen Aufwand, der für die Etablierung eines konditionalen Mausmodells benötigt wird, extrem reduzieren. Diese Möglichkeit wird im Moment in unserem Labor getestet. Diese Strategie ist insbesondere zur konditionalen *cre*-Expression attraktiv, denn anstelle von triple transgenen Mäusen wären hier nur doppelt transgene Tiere notwendig. Ein weiterer Vorteil ist hier, dass der E11-BAC zur Ausprägung der Cre-Rekombinase bereits funktional getestet ist und in seiner bestehenden Form eingesetzt werden kann.

Vermutlich ist die von uns für die Maus entwickelte BAC-Methode auch auf andere Tiermodelle übertragbar. Dies ist insbesondere für die Modellsysteme wichtig, für die keine ES-Zelltechnik verfügbar ist und so der Locus nicht direkt angesteuert werden kann, wie z.B. in der Ratte. Durch die große Sequenz-Homologie zwischen Maus und Ratte kann man annehmen, dass die BAC-Eigenschaften auch hier beibehalten werden. In vielen Gebieten der biomedizinischen oder Verhaltensforschung ist die Ratte immer noch das Modellsystem der Wahl, erst durch die BAC-Strategie rückt die Herstellung eines konditionalen Rattenmodells in greifbare Nähe.



## 7. Zusammenfassung

Systeme zur stringenten Kontrolle der Genexpression sind zur Analyse von Genfunktionen in Säugerzellen und in Modellorganismen von großer Bedeutung. Hier hat sich in den letzten Jahren vor allem das in unserem Labor entwickelte Tet-System durchgesetzt, das auf den Kontrollelementen des Tetrazyklin-Resistenzoperons des Tn10 aus *E. coli* basiert und die Transkription von Genen mittels Doxzyklin (Dox) zu kontrollieren erlaubt. Ein zentrales Element in diesem System ist  $P_{tet}$ , ein artifizieller Promotor, der aus einem RNA Polymerase II-Minimalpromotor und einer Reihe von tet-Operator-Sequenzen besteht. Dieser Promotor wird durch ebenfalls artifizielle Transkriptionsaktivatoren (tTA/rtTA) aktiviert, die Dox-abhängig an die tet-Operatoren binden.

Durch die zufällige Integration der  $P_{tet}$ -kontrollierten Transkriptionseinheiten bei der Herstellung von transgenen Mauslinien zur konditionalen Genexpression unterliegen die Konstrukte dem Einfluss der genomischen Sequenzen am Integrationsort. Dies führt in nur 5-10% der Fälle zu Linien mit guten Regulationseigenschaften. In solchen Linien ist die  $P_{tet}$ -kontrollierte Transkriptionseinheit in einem genomischen Locus integriert, die wir als „still, aber aktivierbar“ (S/A) benannt haben.

In dieser Arbeit wurde die Fragestellung bearbeitet, wie die Herstellung von Tet-regulierten Mauslinien effizienter und reproduzierbarer gestaltet werden kann. Das Problem der Locus-Abhängigkeit nach Integration kann z.B. durch das gezielte Ansteuern von genomischen Loci, die eine regulierte Expression unterstützen, vermieden werden. Eine Alternative ist die Verwendung von großen DNA-Fragmenten, die positionsunabhängig nach genomischer Integration optimale Regulationseigenschaften vermitteln. Da bislang weder solche Konstrukte erhältlich, noch Loci mit S/A-Charakter bekannt sind, war es das Ziel dieser Arbeit, einen entsprechenden genomischen Locus funktional zu identifizieren und als BAC-Fragment zu klonieren.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Mauslinie LC-1 als Kandidat zur Isolierung eines S/A-Locus charakterisiert. Tiere dieser Linie tragen eine bidirektionale Transkriptionseinheit zur Expression des Luziferase- und des Cre-Gens. Zur Untersuchung von LC-1-Mäusen wurden verschiedene Transaktivator-Linien eingesetzt, darunter auch Tiere der Linie  $rTA^{LAP-1}$ , die im Rahmen dieser Arbeit etabliert wurde. Sie besitzt eine gewebespezifische Expression des Transaktivator-Gens  $rTA2^S-S2$  in allen Hepatozyten und in Zellen des Nierencortex. Die Analyse der Dox-abhängigen Transgen-Expression in doppelt transgenen tTA bzw. rtTA/LC-1-Tieren zeigte in allen untersuchten Geweben eine stringente Kontrolle der *luc/cre*-Transkriptionskassette im nicht-induzierten Zustand und eine hohe Aktivierung der beiden Gene ohne Positionseffekte nach Induktion. Diese Linie ist damit nicht nur sehr nützlich als Werkzeug zur induzierbaren gewebespezifischen Rekombination in Mäusen einsetzbar, sondern sie eignet sich auch zur Identifikation des genomischen Integrationslocus.

Aus diesem Grund wurde die Integrationsstelle der LC-1-Linie mit flankierenden genomischen Sequenzen als 95 Kb-Fragment in einem BAC isoliert. Teile des BACs wurden sequenziert und so der genomische Integrationsort des LC-1-Transgens identifiziert. Mit dem BAC-Fragment konnten fünf Mauslinien hergestellt und auf ihre Regulationseigenschaften untersucht werden. In allen BAC-Linien war eine Kontrolle der Luziferaseaktivität über mindestens vier Größenordnungen möglich. Durch diese Experimente konnte gezeigt werden, dass es mit Hilfe der BAC-Technologie möglich ist, die Eigenschaften eines Tet-regulierbaren Locus mit hoher Effizienz zu übertragen und damit die Etablierung von  $P_{tet}$ -kontrollierten Linien durch Mikroinjektion wesentlich zu vereinfachen. Durch die Klonierung des LC-1-Locus wurde außerdem eine genomische Stelle identifiziert, die sich vermutlich generell zur Expression von Tet-regulierten Zielgenen eignet. Durch homologe Rekombination in ES-Zellen kann dieser Locus mit  $P_{tet}$ -kontrollierten Zielgenen angesteuert werden, sodass die Etablierung von funktionalen Linien voraussagbar würde.

## 8. Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit sind veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht :

- Hasan, M.T., Schöning, K., Berger, S., Graewe, W. and Bujard H. (2001). Long-term, noninvasive imaging of regulated gene expression in living mice. *Genesis*, **29**: 116-22.
- Schöning, K., Schwenk, F., Rajewsky, K. and Bujard, H. (2002). Stringent doxycycline dependent control of CRE recombinase *in vivo*. *Nuc Acids Res*, **30**: N23 1-7.
- Schöning, K. & Bujard H. (2002). Generating conditional mouse mutants via tetracycline-controlled gene expression. In: The Transgenic Mouse - Methods and Protocols. Ed. Van Deursen, J. , Hofker, M., Totowa, NJ: Humana, **209**: 69-104.
- Gallagher, A.R., Schöning, K., Brown, Bujard, H. and Ralph Witzgall (2003). Use of the tet-system for inducible protein synthesis in the kidney (zur Veröffentlichung eingereicht).

Poster:

- Schöning, K., Baldinger, T., Welzel, K., Vente, A. and Bujard, H. (2002). A BAC vector for integration-independent regulation of gene activities via tetracycline (Mouse Molecular Genetics meeting, Cold Spring Harbor)

## 9. Literatur

- al-Shawi, R., Kinnaid, J., Burke, J., Bishop, J.O. (1990). Expression of a foreign gene in a line of transgenic mice is modulated by a chromosomal position effect. *Mol Cell Biol*, **10**: 1192-8
- Alam, J. & Cook, J.L. (1990). Reporter genes: application to the study of mammalian gene transcription. *Anal Biochem*, **188**: 245-54.
- Antes, T.J., Namciu, S.J., Fournier, R.E., Levy-Wilson, B. (2001). The 5' boundary of the human apolipoprotein B chromatin domain in intestinal cells. *Biochemistry*, **40**: 6731-42.
- Austin, S., Ziese, M., Sternberg, N. (1981). A novel role for site specific recombination in the maintenance of bacterial replicons. *Cell*, **25**: 729-736.
- Baldinger, T. (2000). Konstruktion eines BAC-Vektors zur Klonierung großer genomischer DNA-Fragmente. Diplomarbeit Universität Heidelberg.
- Beggah, A.T., Escoubet, B., Puttini, S., Cailmail, S., Delage, V., Ouvrard-Pascaud, A., Bocchi, B., Peuchmaur, M., Delcayre, C., Farman, N., Jaisser, F. (2002). Reversible cardiac fibrosis and heart failure induced by conditional expression of an antisense mRNA of the mineralocorticoid receptor in cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**: 7160-5.
- Baron, U. & Bujard, H. (2000). The Tet repressor-based system for regulated gene expression in eukaryotic cells: principles and advances. *Methods Enzymol*, **327**: 659-686.
- Baron, U., Freundlieb, S., Gossen, M., Bujard, H. (1995). Coregulation of two gene activities by tetracycline via a bidirectional promoter. *Nucleic Acids Res*, **23**: 3605-3606.
- Baron, U., Gossen, M., Bujard, H. (1997). Tetracycline-controlled transcription in eukaryotes: novel transactivators with graded transactivation potential. *Nucleic Acids Res*, **25**: 2723-9.
- Bell, A.C., West, A.G., Felsenfeld, G. (2001). Insulators and Boundaries: Versatile regulatory elements in the eukaryotic genome. *Science*, **291**: 447-450.
- Belshaw, P.J., Ho, S.N., Crabtree, G.R., Schreiber, S.L. (1996). Controlling protein association and subcellular localization with a synthetic ligand that induces heterodimerization of proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**: 4604-7.
- Berezney, R., Wie, X. (1998). The new paradigm: integrating genomic function and nuclear architecture. *J Cell Biochem Suppl*, **30-31**: 238-4.
- Berger, S. & Bujard, H. (2003). Novel mouse models in biomedical research: The power of dissecting pathways by quantitative control of gene activities. In: Transgenic Models of Pharmacology, *Handbook of Experimental Pharmacology* (in press).

- Berkovich, I. & Efrat, S. (2001). Inducible and reversible beta-cell autoimmunity and hyperplasia in transgenic mice expressing a conditional oncogene. *Diabetes*, **50**: 2260-7.
- Bevilacqua, A., Kinnunen, L.H., Bevilacqua, S., Mangia, F. (1995). Stage-specific regulation of murine Hsp68 gene promoter in preimplantation mouse embryos. *Dev Biol*, **170**: 467-78.
- Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7**: 1513-23.
- Birren, B. & Lai, E. (1993). Pulsed Field Gel Electrophoreses: A practical Guide. Academic Press, Inc.San Diego, California.
- Böcker, R. & Estler, C.-J. (1981). Comparison of distribution of doxycycline in mice after oral and intravenous application measured by a high-performance liquid chromatography method. *Drug Res*, **31**: 2116-2117.
- Böcker, R., Warnke, L., Estler, C.-J. (1984) Blood and organ concentrations of tetracycline and doxycycline in female mice. *Drug Res*, **34**: 446-448.
- Bockamp, E., Maringer, M., Spangenberg, C., Fees, S., Fraser, S., Eshkind, L., Oesch, F., Zabel, B. (2002). Of mice and models: improved animal models for biomedical research. *Physiol Genomics*, **11**: 115-32.
- Bond, C.T., Sprengel, R., Bissonnette, J.M., Kaufmann, W.A., Pribnow, D., Neelands, T., Storck, T., Baetscher, M., Jerecic, J., Maylie, J., Knaus, H.G., Seeburg, P.H., Adelman, J.P. (2000). Respiration and parturition affected by conditional overexpression of the Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel subunit, SK3. *Science*, **289**: 1942-1946.
- Boshart, M., Weber, F., Jahn, G., Dorsch Hasler, K., Fleckenstein, B., Schaffner, W. (1985). A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell*, **41**: 521-30.
- Brüning, J. C., Michael, M. D., Winnay, J. N., Hayashi, T., Hörsch, D., Accili, D., Goodyear, L. J., and Kahn, C. R. (1998). A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Molecular Cell*, **2**: 559-569.
- Burgess-Beusse, B., Farrell, C., Gaszner, M., Litt, M., Mutskov, V., Recillas-Targa, F., Simpson, M., West, A., Felsenfeld, G. (2002). The insulation of genes from external enhancers and silencing chromatin. *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**: 16433-7.
- Burke, D.T., Carle, G.F., Olson, M.V. (1987). Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. *Science*, **236**: 806-12.
- Casanova, E., Fehsenfeld, S., Mantamadiotis, T., Lemberger, T., Greiner, E., Stewart, A.F., Schutz, G. (2001). A CamKIIalpha iCre BAC allows brain-specific gene inactivation. *Genesis*, **31**: 37-42.

- Christen, U. & von Herrath, M.G. (2002). Transgenic animal models for type 1 diabetes: linking a tetracycline-inducible promoter with a virus-inducible mouse model. *Transgenic Res*, **11**: 587-95.
- Christopherson, K.S., Mark, M.R., Bajaj, V., Godowski, P.J. (1992). Ecdysteroid-dependent regulation of genes in mammalian cells by a *Drosophila* ecdysone receptor and chimeric transactivators. *Proc Natl Acad Sci USA*, **89**: 6314-8.
- Contag, C.H., Spilman, S.D., Contag, P.R., Oshiro, M., Eames, B., Dennery, P., Stevenson, D.K., Benaron, D.A. (1997). Visualizing gene expression in living mammals using a bioluminescent reporter. *Photochem Photobiol*, **66**: 523-531.
- Contag, P.R., Olomu, I.N., Stevenson, D.K., Contag, C.H. (1998). Bioluminescent indicators in living mammals. *Nature Med*, **4**: 245-247.
- Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Court, D.L. (2001). Recombineering: a powerful new tool for mouse functional genomics. *Nat Rev Genet*, **2**: 769-79.
- Crabtree, G.R., Schreiber, S.L. (1996). Three-part inventions: intracellular signaling and induced proximity. *Trends Biochem Sci*, **21**: 418-22.
- Cronin, C, Gluba, W., Scrabble, H. (2001). The *lac* operator-repressor system is functional in the mouse. *Genes & Development*, **15**: 1506-1517.
- Cubitt, A.B., Heim, R., Adams, S.R., Boyd, A.E., Gross, L.A., Tsien, R.Y. (1995). Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem Sci*, **20**: 448-55.
- de Wet, J.R., Wood, K.V., DeLuca, M., Helinski, D.R., Subramani, S. (1987). Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol Cell Biol*, **7**: 725-37.
- Degenkolb, J., Takahashi, M., Ellestad, G.A., Hillen, W. (1991). Structural requirements of tetracycline-Tet repressor interaction: determination of equilibrium binding constants for tetracycline analogs with the Tet repressor. *Antimicrob Agents Chemother*, **35**: 1591-5.
- Delort, J.P. & Capecchi, M.R. (1996). TAXI/UAS: A molecular switch to control expression of genes in vivo. *Hum Gene Ther*, **7**: 809-20.
- Del Punta, K., Puche, A., Adams, N.C., Rodriguez, I., Mombaerts, P. (2002). A divergent pattern of sensory axonal projections is rendered convergent by second-order neurons in the accessory olfactory bulb. *Neuron*, **35**: 1057-66.
- Deuschle, U., Pepperkok, R., Wang, F., Giordano, T. J., McAllister, W. T., Ansorge, W., Bujard, H. (1989). Regulated expression of foreign genes in mammalian cells under the control of coliphage T3 RNA polymerase and *lac* repressor. *Proc Natl Acad Sci USA*, **86**: 5400-5404.

- Diamond, I., Owolabi, T., Marco, M., Lam, C., Glick, A. (2000). Conditional gene expression in the epidermis of transgenic mice using the tetracycline-regulated transactivators tTA and rTA linked to the keratin 5 promoter. *J Invest Dermatol*, **115**: 788-94.
- Dower, W. J., Miller, J. F., Ragsdale, C. W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res*, **16**: 6127-45.
- Emami, K.H. & Carey, M. (1992). A synergistic increase in potency of a multimerized VP16 transcriptional activation domain. *EMBO J*, **11**: 5005-12.
- Eszterhas, S.K., Bouhassira, E.E., Martin, D.I., Fiering, S. (2002). Transcriptional interference by independently regulated genes occurs in any relative arrangement of the genes and is influenced by chromosomal integration position. *Mol Cell Biol*, **22**: 469-79.
- Evans, R. M. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, **240**: 889-95.
- Fedorov, L.M., Tyrsin, O.Y., Krenn, V., Chernigovskaya, E.V., Rapp, U.R. (2001). Tet-system for the regulation of gene expression during embryonic development. *Transgenic Res*, **10**: 247-258.
- Felsher, D.W. & Bishop, J.M. (1999). Reversible tumorigenesis by MYC in hematopoietic lineages. *Mol Cell*, **4**: 199-207.
- Freundlieb, S., Schirra-Muller, C., Bujard, H. (1999). A tetracycline controlled activation/repression system with increased potential for gene transfer into mammalian cells. *J Gene Med*, **1**: 4-12.
- Frisch, M., Frech, K., Klingenhoff, A., Cartharius, K., Liebich, I., Werner, T. (2002). In silico prediction of scaffold/matrix attachment regions in large genomic sequences. *Genome Res*, **12**: 349-54.
- Gaensler, K.M., Kitamura, M., Kann, Y.W. (1993). Germ-line transmission and developmental regulation of a 150-kb yeast artificial chromosome containing the human beta-globin locus in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, **90**: 11381-5.
- Gallagher, A.R., Schöning, K., Brown, N., Bujard, H., Witzgall, R.: Use of the Tet-system for inducible protein synthesis in the kidney (zur Veröffentlichung eingereicht).
- Gay, P., Le Coq, D., Steinmetz, M., Ferrari, E., Hoch, J.A. (1983). Cloning structural gene *sacB*, which codes for exoenzyme levansucrase of *Bacillus subtilis*: expression of the gene in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **153**: 1424-31.
- Gerasimova, T.I. & Corces, V.G. (1998). Polycomb- and trithorax-group proteins mediate the function of a chromatin insulator. *Cell*, **92**: 511-521.
- Gerasimova, T.I. & Corces, V.G. (2001). Chromatin Insulators and Boundaries: Effects on Transcription and Nuclear Organization. *Ann Rev Genetics*, **35**: 193-208.

- Geyer, P. K. (1997). The role of insulator elements in defining domains of gene expression. *Curr Opin Genet Dev*, **7**: 242-8.
- Giraldo, P. & Montoliu, L. (2001). Size matters: use of YACs, BACs and PACs in transgenic animals. *Transgenic Res*, **10**: 83-103.
- Go, W. & Ho, S. (2002). Optimization and direct comparison of the dimerizer and reverse tet transcriptional control systems. *The Journal of Gene Medicine*, **4**: 258-270.
- Gorman, C. & Bullock, C. (2000). Site-specific gene targeting for gene expression in eukaryotes. *Curr Opin Biotechnol*, **11**: 455-60.
- Gossen, M., Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci USA*, **89**: 5547-5551.
- Gossen, M., Bonin, A.L., Bujard, H. (1993). Control of gene activity in higher eukaryotic cells by prokaryotic regulatory elements. *Trends Biochem Sci*, **18**: 471-5.
- Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Mueller, G., Hillen, W., Bujard, H. (1995). Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science*, **268**: 1766-1769.
- Gould, S.J., Subramani, S. (1988). Firefly luciferase as a tool in molecular and cell biology. *Anal Biochem*, **175**: 5-13.
- Graham, F.L. & Eb, A.J. (1973). Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. *Virology*, **54**: 536-9.
- Gronemeyer, H. (1992). Control of transcription activation by steroid hormone receptors. *FASEB J*, **6**: 2524-9.
- Gu, H., Marth, J.D., Orban, P.C., Mossmann, H., Rajewsky, K. (1994). Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type specific gene targeting. *Science*, **265**: 103-106.
- Gunther, E.J., Belka, G.K., Wertheim, G.B., Wang, J., Hartman, J.L., Boxer, R.B., Chodosh, L.A. (2002). A novel doxycycline-inducible system for the transgenic analysis of mammary gland biology. *FASEB J*, **16**: 283-92.
- Hansen, D. & Hillen, W. (1987). Tryptophan in alpha-helix 3 of Tet repressor forms a sequence-specific contact with tet operator in solution. *J Biol Chem*, **262**: 12269-74.
- Harvey, D.M. & Caskey, C.T. (1998). Inducible control of gene expression: prospects for gene therapy. *Curr Opin Chem Biol*, **2**: 512-8.
- Hasan, M.T., Schöning, K., Berger, S., Graewe, W., Bujard, H. (2001). Long-term, noninvasive imaging of regulated gene expression in living mice. *Genesis*, **29**: 116-22.
- Hasegawa, K. & Nakatsuji, N. (2002). Insulators prevent transcriptional interference between two promoters in a double gene construct for transgenesis. *FEBS Lett*, **520**: 47-52.

- Hillen, W. & Wissmann, A. (1989). In: *Protein-Nucleic Acid Interaction. Topics in molecular and structural Biology*, eds. Saenger, W. & Heinemann, U. (Macmillan Press, London) **10**, 143-162.
- Hillen, W., Berens, C. (1994). Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance. *Annu Rev Microbiol*, **48**: 345-69.
- Hlavka, J. J. & Boothe, J. H. (1985). The Tetracyclines, Handbook of experimental Pharmacology Vol. 78, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo.
- Hogan, B., Beddington, R., Costantini, Lacy, E. (1994). Manipulating the mouse Embryo. A laboratory manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Hsu, S.M., Raine, L., Fanger, H. et al. (1981). A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. *Am J. Clin Pathol*, **75**: 734-738.
- Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, **96**: 23-8.
- Itzhaki, J.E., Gilbert, C.S., Porter, A.C. (1997). Construction by gene targeting in human cells of a 'conditional' CDC2 mutant that rereplicates its DNA. *Nat Genet*, **15**: 258-65.
- Kalos, M., Fournier, R.E. (1995). Position-independent transgene expression mediated by boundary elements from the apolipoprotein B chromatin domain. *Mol Cell Biol*, **15**: 198-207.
- Kellum, R. & Schedl, P. (1991). A position effect assay for boundaries of higher order chromosomal domains. *Cell*, **64**: 941-950
- Kistner, A. (1996). Etablierung Tetrazyklin-kontrollierter Expressionssysteme in transgenen Mäusen. Dissertation, Universität Heidelberg.
- Kistner, A., Gossen, M., Zimmermann, F., Jurecic, J., Ullmer, C., Luebbert, H., Bujard, H. (1996). Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**: 10933-10938.
- Kleinschmidt, C., Tovar, K., Hillen, W., Porschke, D. (1988). Dynamics of repressor-operator recognition: the Tn10-encoded tetracycline resistance control. *Biochemistry*, **27**: 1094-104.
- Kliwer, S.A., Umesono, K., Mangelsdorf, D. J., Evans, R. M. (1992). Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D3 signalling. *Nature*, **355**: 446-9.
- Kühn, R., Schwenk, F., Aguet, M., Rajewsky, K. (1995). Inducible gene targeting in mice. *Science*, **269**: 1427-9.
- Kühn R & Schwenk F. (2002). Conditional knockout mice. *Methods Mol Biol*, **209**: 159-85.



- Kulkarni, R. N., Brüning, J. C., Winnay, J. N., Postic, C., Magnuson, M. A., Kahn, C. R. (1999). Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic b cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes. *Cell* **96**, 329-339.
- Kwan, K.M. (2002). Conditional alleles in mice: Practical considerations for tissue-specific knockouts. *Genesis*, **32**: 49-62.
- Lavon, I., Goldberg, I., Amit, S., Landsman, L., Jung, S., Tsuberi, B.Z., Barshack, I., Kopolovic, J., Galun, E., Bujard, H., Ben-Neriah, Y. (2000). High susceptibility to bacterial infection, but no liver dysfunction, in mice compromised for hepatocyte NF-kappaB activation. *Nat Med*, **6**: 573-7.
- Lee, E.C., Yu, D., Martinez de Velasco, J., Tessarollo, L., Swing, D.A., Court, D.L., Jenkins, N.A., Copeland, N.G. (2001). A highly efficient Escherichia coli-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA. *Genomics*, **73**: 56-65.
- Lee, P., Morley, G., Huang, Q., Fischer, A., Seiler, S., Horner, J.W., Factor, S., Vaidya, D., Jalife, J., Fishman, G.I. (1998). Conditional lineage ablation to model human diseases. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**: 11371-6.
- Lewandoski, M. (2001). Conditional control of gene expression in the mouse. *Nature Reviews* **2**: 743-755.
- Lutz, R. & Bujard, H. (1997). Independent and tight regulation of transcriptional units in Escherichia coli via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I1-I2 regulatory elements. *Nucleic Acids Res*, **25**: 1203-10.
- Mayford, M., Bach, M.E., Huang, Y.-Y., Wang, L., Hawkins, R.D., Kandel, E.R. (1996). Control of memory formation through regulated expression of a CaMKII transgene. *Science*, **274**: 1678-1683.
- McClelland, M. (1981). The effect of sequence specific DNA methylation on restriction endonuclease cleavage. *Nucleic Acids Res*, **9**: 5859-66.
- Metzger, D. & Feil, R. (1999). Engineering the mouse genome by site-specific recombination. *Curr Opin Biotechnol*, **10**: 470-6.
- Michael, M. D., Kulkarni, R. N., Postic, C., Previs, S. F., Shulman, G. I., Magnuson, M. A., and Kahn, C. R. (2000). Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. *Molecular Cell*, **6**: 87-97.
- Minichiello, L., Korte, M., Wolfer, D., Kühn, R., Unsicker, K., Cestari, V., Rossi-Arnaud, C., Lipp, H. P., Bonhoeffer, T., and Klein, R. (1999). Essential role for TrkB receptors in hippocampus-mediated learning. *Neuron*, **24**: 401-414.
- Montoliu, L. (2002). Gene transfer strategies in animal transgenesis. *Cloning Stem Cells*, **4**: 39-46.

- Nabirochkin, S., Ossokina, M., Heidmann, T. (1998). A nuclear matrix/scaffold attachment region co-localizes with the gypsy retrotransposon insulator sequence. *J Biol Chem*, **273**: 2473-9.
- Nadeau, J.H., Balling, R., Barsh, G., Beier, D., Brown, S.D., Bucan, M., Camper, S., Carlson, G., Copeland, N. *et al.* & Zimmer, A. (2001). Sequence interpretation. Functional annotation of mouse genome sequences. *Science*, **16**: 1251-1255.
- Namciu, S.J., Blochlinger, K.B., Fournier, R.E. (1998). Human matrix attachment regions insulate transgene expression from chromosomal position effects in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol*, **18**: 2382-91.
- Neuhold, L.A., Killar, L., Zhao, W., Sung, M.L., Warner, L., Kulik, J., Turner, J., Wu, W., Billingham, C., Meijers, T., Poole, A.R., Babij, P., DeGennaro, L.J. (2001). Postnatal expression in hyaline cartilage of constitutively active human collagenase-3 (MMP-13) induces osteoarthritis in mice. *J Clin Invest*, **107**: 35-44.
- No, D., Yoa.,T.P., Evans, R.M.(1996). Ecdysone inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, **90**: 1657-1661.
- Nordeen, S.K. (1988). Luciferase reporter gene vectors for analysis of promoters and enhancers. *Biotechniques*, **6**: 454-8.
- Nover, L. (1991). Gene technology and functional analyses of heat shock genes, in *Heat Shock Response*, ed. Nover, L. (CRC Press, Boca Raton), 167-220.
- Osoegawa, K., Woon, P.Y., Zhao, B., Frengen, E., Tateno, M., Catanese, J.J., de Jong, P.J.(1998). An improved approach for construction of bacterial artificial chromosome libraries. *Genomics*, **52**: 1-8.
- Palmiter, R.D. & Brinster, R.L. (1986). Germ-line transformation of mice. *Annu Rev Genet*, **20**: 465-99.
- Perea, J., Robertson, A., Tolmachova, T., Muddle, J., King, R.H., Ponsford, S., Thomas, P.K., Huxley, C. (2001). Induced myelination and demyelination in a conditional mouse model of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Human Mol Genetics* **10**: 1007-1018.
- Pierson, T.M., Wang, Y., DeMayo, F.J., Matzuk, M.M., Tsai, S.Y., O'Malley, B.W. (2000). Regulable expression of inhibin A in wild-type and inhibin alpha null mice. *Mol Endocrinol*, **14**: 1075-85.
- Polisky, B., Greene, P., Garfin, D.E., McCarthy, B.J., Goodman, H.M., Boyer, H.W. (1975). Specificity of substrate recognition by the EcoRI restriction endonuclease. *Proc Natl Acad Sci USA*, **72**: 3310-4.
- Pollok, R. & Rivera, V.M. (1999). Regulation of gene expression with synthetic dimerizers. *Methods in Enzymology*, **306**: 263-281.

- Radomska, H.S., Gonzalez, D.A., Okuno, Y., Iwasaki, H., Nagy, A., Akashi, K., Tenen, D.G., Huettner, C.S. (2002). Transgenic targeting with regulatory elements of the human CD34 gene. *Blood*, **100**: 4410-9.
- Resnitzky, D., Gossen, M., Bujard, H., Reed, S.I. (1994). Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. *Mol Cell Biol* **14**: 1669-79.
- Rijnkels, M. & Rosen, J.M. (2001). Adenovirus-Cre-mediated recombination in mammary epithelial early progenitor cells. *J Cell Sci*, **114**: 3147-53.
- Rivera, V.M., Clackson, T., Natesan, S., Pollock, R., Amara, J.F., Keenan, T., Magari, S.R., Phillips, T., Courage, N.L., Cerasoli, F. Jr., Holt, D.A., Gilman, M. (1996). A humanized system for pharmacologic control of gene expression. *Nat Med*, **2**: 1028-32.
- Rivera, V.M., Ye, X., Courage, N.L., Sachar, J., Cerasoli, F. Jr., Wilson, J.M., Gilman, M. (1999). Long-term regulated expression of growth hormone in mice after intramuscular gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**: 8657-62.
- Robertson, G., Garrick, D., Wu, W., Kearns, M., Martin, D., Whitelaw, E. (1995). Position-dependent variegation of globin transgene expression in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**: 5371-5.
- Rodriguez, I., Del Punta, K., Rothman, A., Ishii, T., Mombaerts, P. (2002). Multiple new and isolated families within the mouse superfamily of V1r vomeronasal receptors. *Nat Neurosci*, **5**: 134-40.
- Ryding, A.D., Sharp, M.G., Mullins, J.J. (2001). Conditional transgenic technologies. *J Endocrinol*, **171**: 1-14.
- Sadowski, I., Ma, J., Triezenberg, S., Ptashne, M. (1988). GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator. *Nature*, **335**: 563-4.
- Saez, E., No, D., West, A., Evans, R. M. (1997). Inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Curr Opin Biotechnol*, **8**: 608-16.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**: 487-91.
- Sande, M.A. & Mandell, G.L. (1990) in: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Gilman, A.G., Rall, T.W., Nies, A.S. & Taylor, P. (Ed.) Pergamon Press, New York.
- Sauer, B. (1998). Inducible gene targeting in mice using the Cre/loxP system. *Methods Enzymol*, **14**: 381-392.
- Schedl, A., Montoliu, L., Kelsey, G., Schütz, G. (1993). A yeast artificial chromosome covering the tyrosinase gene confers copy number-dependent expression in transgenic mice. *Nature*, **362**: 258-61.

- Scherf, M., Klingenhoff, A., Werner, T. (2000). Highly specific localization of promoter regions in large genomic sequences by PromoterInspector: a novel context analysis approach. *J Mol Biol*, **297**: 599-606.
- Schmidt, E.E., Taylor, D.S., Prigge, J.R., Barnett, S., Capecchi, M.R. (2000). Illegitimate Cre-dependent chromosome rearrangements in transgenic mouse spermatids. *Proc Natl Acad Sci USA*, **97**: 13702-07.
- Schönig, K., Bujard, H. (2002). Generating conditional mouse mutants via tetracycline-controlled gene expression. *Methods Mol Biol*, **209**: 69-104.
- Schönig, K., Schwenk, F., Rajewsky, K., Bujard, H. (2002). Stringent doxycycline dependent control of CRE recombinase in vivo. *Nucleic Acids Res*, **30**: e134.
- Schwenk, F. (1997). Etablierung einer Methode zur induzierbaren und zelltypspezifischen Genveränderung in der Maus. Dissertation Universität Köln.
- Schwenk, F., Baron, U., Rajewsky, K. (1995). A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells. *Nucleic Acids Res*, **23**: 5080-1.
- Scrabble, H. & Stambrook, P.J. (1997). Activation of the lac repressor in the transgenic mouse. *Genetics*, **147**: 297-304.
- Searle, P.F., Stuart, G.W., Palmiter, R.D. (1985). Building a metal-responsive promoter with synthetic regulatory elements. *Mol Cell Biol*, **5**: 1480-9.
- Shin, K.M., Levorse, J.M., Ingram, R.S., Tilghman, S.M. (1999). The temporal requirement for endothelin receptor-B signaling during neural crest development. *Nature*, **402**: 496-501.
- Shizuya, H., Birren, B., Kim, U.J., Mancino, V., Slepak, T., Tachiiri, Y., Simon, M. (1992). Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc Natl Acad Sci USA*, **89**: 8794-7.
- Silver, D.P. & Livingston, D.M. (2001). Self-excising retroviral vectors encoding the Cre recombinase overcome Cre-mediated cellular toxicity. *Mol Cell*, **8**: 233-43.
- Singh, G.B., Kramer, J.A., Krawetz, S.A. (1997). Mathematical model to predict regions of chromatin attachment to the nuclear matrix. *Nucleic Acids Res*, **25**: 1419-25.
- Soriano P. (1999). Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet*, **21**: 70-1.
- Soulier, S., Stinnakre, M.G, Lepourry, L., Mercier, J.-C., Vilotte, J.-L (1999). Use of doxycycline-controlled gene expression to reversibly alter milk-protein composition in transgenic mice. *Eur J Biochem*, **260**: 533-539.

- Southern, P.J. & Berg, P. (1982). Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. *J Mol Appl Genet*, **1**: 327-41.
- Spielmann, H., Krüger, C., Tenschert, B., Vogel, R. (1986). Studies on the embryotoxic risk of drug treatment during the preimplantation period in the mouse. *Drug Res*, **36**: 219-223.
- Sternberg, N., Sauer, B., Hoess, R., Abremski, K. (1986). Bacteriophage P1 *cre* gene and its regulatory region. *J Mol Biol*, **187**: 197-212.
- Stief, A., Winter, D.M., Stratling, W.H., Sippel, A.E. (1989). A nuclear DNA attachment element mediates elevated and position-independent gene activity. *Nature*, **341**: 343-5.
- Stinnakre, M.G., Soulier, S., Schibler, L., Lepourry, L., Mercier, J.C., Vilotte, J.L. (1999). Position-independent and copy-number-related expression of a goat bacterial artificial chromosome alpha-lactalbumin gene in transgenic mice. *Biochem J*, **339**: 33-6.
- Sweeney, T.J., Mailander, V., Tucker, A.A., Olomu, A.B., Zhang, W., Cao, Y., Negrin, R.S., Contag, C.H. (1999). Visualizing the kinetics of tumor cell clearance in living animals. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**: 12044-12049.
- Takahashi, M., Altschmied, L., Hillen, W. (1986). Kinetic and equilibrium characterization of the Tet repressor-tetracycline complex by fluorescence measurements. Evidence for divalent metal ion requirement and energy transfer. *J Mol Biol*, **187**: 341-8.
- Talbot, D., Descombes, P., Schibler, U. (1994) The 5' flanking region of the rat LAP (C/EBP $\beta$ ) gene can direct high-level, position-independent, copy number-dependent expression in multiple tissues in transgenic mice. *Nucl Acid Res*, **22**: 756-766.
- Tanaka, M. (1996). Modulation of promoter occupancy by cooperative DNA binding and activation-domain function is a major determinant of transcriptional regulation by activators in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**: 4311-5.
- Thiele, D.J. (1992). Metal-regulated transcription in eukaryotes. *Nucleic Acids Res*, **20**: 1183-91.
- Thomas, K.R. & Capecchi, M.R. (1987). Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*, **51**: 503-12.
- Thyagarajan, B., Guimaraes, M.J., Groth, A.C., Calos, M.P. (2000), Mammalian genomes contain active recombinase recognition sites. *Gene*, **244**: 47-54.
- Triezenberg, S.J., Kingsbury, R.C., McKnight, S.L. (1988). Functional dissection of VP16, the trans-activator of herpes simplex virus immediate early gene expression. *Genes Dev*, **2**: 718-29.
- Tsien, J.Z., Huerta, P. T., Tonegawa, S. (1996). The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell*, **87**: 1327-1338.

- Urlinger, S., Baron, U., Thellmann, M., Hasan, M., Bujard, H., Hillen, W. (2000). Exploring the sequence space for tetracycline dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA*, **97**: 7963-7968.
- Utomo, A.R., Nikitin, A.Y., Lee, W.H. (1999). Temporal, spatial, and cell type-specific control of Cre-mediated DNA recombination in transgenic mice. *Nat Biotechnol*, **17**:1091-6.
- Valencik, M.L., McDonald, J.A. (2001). Codon optimization markedly improves doxycycline regulated gene expression in the mouse heart. *Transgenic Res*, **10**: 269-75.
- Villemure, J.F., Savard, N., Belmaaza, A. (2001). Promoter suppression in cultured mammalian cells can be blocked by the chicken beta-globin chromatin insulator 5'HS4 and matrix/scaffold attachment regions. *J Mol Biol*, **312**: 963-74.
- Vooijs, M., Jonkers, J., Berns, A. (2001). A highly efficient ligand-regulated Cre recombinase mouse line shows that LoxP recombination is position dependent. *EMBO Rep*, **2**: 292-7.
- Voziyanov, Y., Pathania, S., Jayaram, M. (1999). A general model for site-specific recombination by the integrase family recombinases. *Nucleic Acids Res*, **27**: 930-941.
- Wang, Y., O'Malley, B.W., Tsai, S.Y. (1997a). Inducible system designed for future gene therapy. *Methods Mol Biol.*, **63**: 401-13.
- Wang, Y., DeMayo, F.J., Tsai, S.Y., O'Malley, B.W. (1997b). Ligand-inducible and liver-specific target gene expression in transgenic mice. *Nat Biotechnol*, **15**: 239-43.
- Wang, M.L., Huang, L., Bongard-Pierce, D.K., Belmonte, S., Zachgo, E.A., Morris, J.W., Dolan, M., Goodman, H.M. (1997c). Construction of an approximately 2 Mb contig in the region around 80 cM of Arabidopsis thaliana chromosome 2. *Plant J*, **12**: 711-30.
- Wang, R., Ferrell, L.D., Faouzi, S., Maher, J.J., Bishop, J.M. (2001). Activation of the Met receptor by cell attachment induces and sustains hepatocellular carcinomas in transgenic mice. *J Cell Biol*, **153**: 1023-34.
- Wang, Y., O'Malley, B.W., Jr., Tsai, S. Y., O'Malley, B.W. (1994). A regulatory system for use in gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**: 8180-4.
- Waterston, R.H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J.F., Agarwal, P., Agarwala, R., Singer, J.B., Slater, G., Smit, A., Smith, D.R., Spencer, B., Stabenau, A., Stange-Thomann, N., Sugnet, C. *et al.* & Lander, E.S. (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, **420**: 520-62.
- Werner, T. (1999). Models for prediction and recognition of eukaryotic promoters. *Mamm Genome*, **10**: 168-75.
- Wiekowski, M.T., Chen, S.C., Zalamea, P., Wilburn, B.P., Kinsley, D.J., Sharif, W.W., Jensen, K.K., Hedrick, J.A., Manfra, D., Lira, S.A. (2001). Disruption of neutrophil migration in a conditional transgenic model: evidence for CXCR2 desensitization in vivo. *J Immunol*, **167**: 7102-10.

Wilson, C., Bellen, H.J., Gehring, W.J. (1990). Position effects on eukaryotic gene expression. *Annu Rev Cell Biol*, **6**: 679-714.

Witzgall, R., O'Leary, E., Leaf, A., Onaldi, D., Bonventre, J.V. (1994). The Kruppel-associated box-A (KRAB-A) domain of zinc finger proteins mediates transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**: 4514-4518.

Yamamoto, A., Lucas, J.J., Hen, R. (2000). Reversal of neuropathology and motor dysfunction in a conditional model of Huntington's disease. *Cell*, **101**: 57-66.

Yao, F., Svensjo, T., Winkler, T., Lu, M., Eriksson, C., Eriksson, E. (1998). Tetracycline repressor, tetR, rather than the tetR-mammalian cell transcription factor fusion derivatives, regulates inducible gene expression in mammalian cells. *Hum Gene Ther*, **9**: 1939-50.

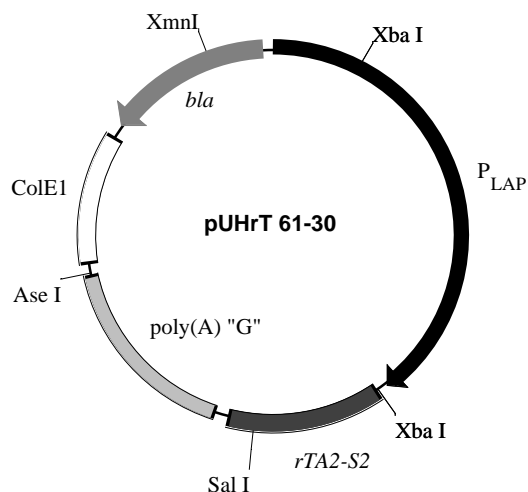
Yao, T.P., Segraves, W.A., Oro, A.E., McKeown, M., Evans, R. M. (1992). Drosophila ultraspiracle modulates ecdysone receptor function via heterodimer formation. *Cell*, **71**: 63-72.

Yarranton, G.T. (1992). Inducible vectors for expression in mammalian cells. *Curr Opin Biotechnol*, **3**: 506-11.

Zhu, Z., Ma, B., Homer, R.J., Zheng, T., Elias, J.A.(2001). Use of the tetracycline-controlled transcriptional silencer (tTS) to eliminate transgene leak in inducible overexpression transgenic mice. *J Biol Chem*, **276**: 25222-29.

## 10. Anhang

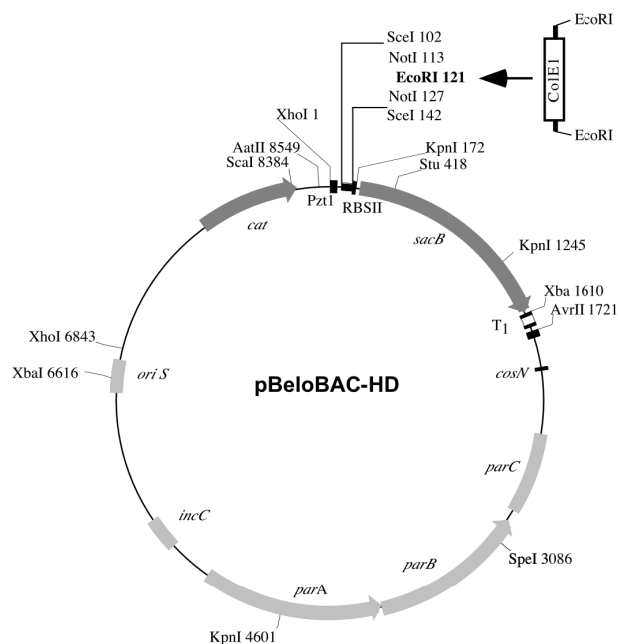
### 10.1 Grafische Darstellung des Plasmids pUHRt61-30



#### Schematische Darstellung des Vektors pUHRt61-30

In diesem eukaryotischen Expressionsplasmid steht das *rTA2<sup>S</sup>-S2*-Gen (Urlinger *et al.*, 2000) unter der transkriptionellen Kontrolle des leberspezifischen LAP-Promotors (Talbot *et al.*, 1994). Dem Gen folgt das  $\beta$ -Globin Polyadenylierungssignal (Poly(A)G). Das Plasmid trägt den ColE1-Replikationsursprung zur Vermehrung in *E. coli* und das  $\beta$ -Laktamasegen (*bla*) zur Selektion auf Ampizillinresistenz. Relevante Schnittstellen für Restriktionsenzyme sind eingezeichnet. Das XmnI-AsI-Fragment dieses Plasmids wurde benutzt, um die Mauslinie rTA<sup>LAP</sup>-1 herzustellen.

### 10.2 Grafische Darstellung des BAC-Vektors pBeloBAC-HD



#### Schematische Darstellung des Vektors pBeloBAC-HD

Dieser Vektor zur Klonierung von großen DNA-Fragmenten basiert auf pBeloBAC11, er trägt an eine *sacB*-Selektionskassette mit einem PstI-Promotor (Lutz & Bujard, 1997) und veränderter MCS. Das Plasmid enthält den Replikationsursprung des F-Faktors (*oriS*) und die Stabilitätsgene *parA*, *parB* und *parC*. Zur Erleichterung der präparativen Aufreinigung wurde der ColE1-Replikationsursprung in die MCS eingefügt, vor der Klonierung von genomischen Fragmenten wird er durch EcoRI-Verdau entfernt

### 10.3 Ergebnisse der Sequenzanalyse des in BAC E11 klonierten genomischen DNA-Fragments

Siehe folgende Seiten.



[License Agreement](#)[Your comments](#)

**EIDorado** based on  
NCBI human genome, build 30  
Mouse genome, MGSv3



## Annotation and Analysis

[online demo](#)

Generate table below

<input checked="" type="checkbox"/> User Sequence (1)	<input checked="" type="checkbox"/> Gene-associated Promoter (2)	<input type="checkbox"/> Promoter/Inspector Prediction (0)	<input checked="" type="checkbox"/> Transcription Start site (0)
<input checked="" type="checkbox"/> Primary Transcript (2)	<input type="checkbox"/> 5'UTR (0)	<input checked="" type="checkbox"/> Exon (8)	<input checked="" type="checkbox"/> Intron (6)
<input type="checkbox"/> 3'UTR (0)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> Repeat Region (14)	<input type="checkbox"/> Variation (0)
<input checked="" type="checkbox"/> SMAR (6)	<input type="checkbox"/>		

Colour all elements overlapping with  **⚙ Your Input:** suite\_sch\_nlg\_1.seq (75619 bps)

Your query was mapped to / found on NW\_000251 (+) on chromosome 6 of *Mus musculus*  
Extracted fragment: NW\_000251 between 8056598 and 8159456 (102859 bps).

Annotated sequence in Genbank format: [GX\\_064801](#)

GREEN annotation text: elements proximal to start or end of genes  
RED annotation text: element overlapping coding exons  
ORANGE annotation text: elements overlapping other annotated elements

Genbank Accession	Start Coordinate	End Coordinate	Length	Feature	Annotation	Associated with LOC243411 (5' upstream region)	Distance to LOC243411	Interpret / analyse
<1	33	n/a	510 bp	SMAR				<input checked="" type="checkbox"/>
5001	72153	+	67153 bp	User Sequence				<input type="checkbox"/>
10169	10483	n/a	315 bp	SMAR				<input checked="" type="checkbox"/>
10481	11081	+	601 bp	Gene-associated Promoter	Associated with LOC243411 (XM_144751) Quality=bronze	498 bp upstream of LOC243411. 100 bp overlap with 5' end of LOC243411. Overlap with exon 1 of LOC243411.		<input type="checkbox"/>
10981	51414	+	40434 bp	Primary Transcript	LOC243411 (XM_144751)	- more gene info...		<input type="checkbox"/>
10981	11107	+	127 bp	Exon	LOC243411 (XM_144751)	Exon 1		<input type="checkbox"/>
11108	35477	+	24370 bp	Intron	LOC243411 (XM_144751)	Intron 1		<input type="checkbox"/>
16129	17098	n/a	970 bp	SMAR	SMAR	Within intron 1 of LOC243411.		<input checked="" type="checkbox"/>
18934	19523	n/a	590 bp	SMAR	SMAR	Within intron 1 of LOC243411.		<input checked="" type="checkbox"/>
35478	35774	+	297 bp	Exon	LOC243411 (XM_144751)	Exon 2		<input type="checkbox"/>

[\[Analyze\]](#)



35775	51253	+	15479 bp	Intron	LOC243411 (XM_144751)	Intron 2	<input type="checkbox"/>
43969	44313	n/a	345 bp	SMAR	SMAR	Within Intron 2 of LOC243411.	<input checked="" type="checkbox"/>
51254	51414	+	161 bp	Exon	LOC243411 (XM_144751)	Exon 3	<input type="checkbox"/>
55011	97859	-	42849 bp	Primary Transcript	LOC209289 (XM_144752)	- more gene info...	<input type="checkbox"/>
55011	55100	-	90 bp	Exon	LOC209289 (XM_144752)	Exon 5	<input type="checkbox"/>
55101	71974	-	16874 bp	Intron	LOC209289 (XM_144752)	Intron 4	<input type="checkbox"/>
71975	72067	-	93 bp	Exon	LOC209289 (XM_144752)	Exon 4	<input type="checkbox"/>
72068	72462	-	395 bp	Intron	LOC209289 (XM_144752)	Intron 3	<input type="checkbox"/>
72463	72613	-	151 bp	Exon	LOC209289 (XM_144752)	Exon 3	<input type="checkbox"/>
72614	76760	-	4147 bp	Intron	LOC209289 (XM_144752)	Intron 2	<input type="checkbox"/>
76761	76826	-	66 bp	Exon	LOC209289 (XM_144752)	Exon 2	<input type="checkbox"/>
76827	97032	-	20206 bp	Intron	LOC209289 (XM_144752)	Intron 1	<input type="checkbox"/>
77364	78078	n/a	715 bp	SMAR	SMAR	Within Intron 1 of LOC209289.	<input type="checkbox"/>
97033	97859	-	827 bp	Exon	LOC209289 (XM_144752)	Exon 1	<input type="checkbox"/>
97759	98359	-	601 bp	Gene-associated Promoter	Associated with LOC209289 (XM_144752) Quality=bronze (5' upstream region)	100 bp overlap with 5' end of LOC209289. Overlap with exon 1 of LOC209289.	<input type="checkbox"/> [Analyze]

## Extract Sequence

Which matches?

☒ selected matches in above list  
☐ all matches  
☐ by sequence: position from  to  (sense\_strand)

Output file

sule\_Sch\_nig\_1\_2.e

Extract sequence of selected features

## Statistics:

Total numbers of annotated elements	
Element	Number
3'UTR	0
5'UTR	0